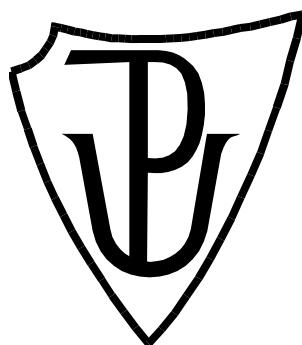


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Validácia genotypizácie HPV33 a HPV51
v cervikálnych steroch**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:

Bc. Júlia Martinková

Študijný program:

N1501 Experimentální biologie

Študijný obor:

Experimentální biologie

Forma štúdia:

Prezenční

Vedúca práce:

Mgr. Hana Jaworek

Termín odovzdania práce:

11. 5. 2018

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora:	Bc. Júlia Martinková
Názov práce:	Validácia genotypizácie HPV33 a HPV51 v cervikálnych steroch
Typ práce:	Diplomová
Pracovisko:	Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařska fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc
Vedúca práce:	Mgr. Hana Jaworek
Rok obhajoby práce:	2018

Abstrakt:

Cervikálny karcinóm (CCa) je spôsobený perzistentnou infekciou vysokorizikových ľudských papilomavírusov (hrHPV). Novo navrhnuté detekčné systémy boli testované na 40 vzorkách, u ktorých bola opakovanou analýzou potvrdená prítomnosť HPV33 v 95 %. U 57 vzorkách bola opakovanou detekciou potvrdená prítomnosť HPV51 v 98,3 % prostredníctvom multiplex real-time PCR. Genotypizácia všetkých cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov bola prevedená prostredníctvom PapilloCheck® HPV-Screening (Greiner Bio-One). Analytické parametre získané z dát vyhodnotili 95% senzitivitu pre HPV33 a 98,2% pre HPV51. Špecifická pre obidva genotypy bola 100 %. Detekčné systémy umožnili analyzovať v multiplexu až 4 kópie/reakciu u HPV33. Boli schopné detekovať integrovanú (I) a zmiešanú (Z) formu HPV, ktoré predstavujú zvýšené riziko vzniku cervikálnych intraepiteliálnych lézií s následnou progresiou do CCa. I forma bola zistená v 67,5 % a Z v 20 % vzoriek u HPV33. V prípade HPV51 nebola detekovaná ani jedna z nich. Detekčné systémy boli aplikované len na hrHPV HPV33 a HPV51, ktoré sú v českej populácii zastúpené v minimálnom množstve. Tieto testy by boli vhodné pre ďalší výskum iných hrHPV. Zároveň by bolo potrebné vyšetriť omnoho väčšie množstvo vzoriek u žien nad 30 rokov, aby boli navrhnuté detekčné systémy zvažované na screening HPV.

Kľúčové slová:	cervikálny karcinóm, HPV test, real-time PCR
Počet strán:	55
Počet príloh:	6
Jazyk:	slovenský

Bibliographical identification

Author's name and surname: Bc. Júlia Martinková
Title of thesis: Validation of HPV33 and HPV51 genotypization in cervical smears
Type of thesis: Diploma
Department: Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine, Palacky University and Faculty Hospital Olomouc
Supervisor: M.Sc. Hana Jaworek
The year of presentation: 2018

Abstract:

Cervical carcinoma (CCa) is caused by a persistent infection of high-risk human papillomaviruses (hrHPV). Recently designed detection systems have been tested on 40 samples, which were repeatedly confirmed by the presence of HPV33 in 95 %. In 57 samples, repeated detection confirmed the presence of HPV51 in 98.3 % via multiplex real-time PCR. Genotyping of all cervical and cervico-vaginal smears has been performed by PapilloCheck[®] HPV-Screening (Greiner Bio-One). Review from analytical data we have got in 95% sensitivity for HPV33 and 98.2% for HPV51. The specificity for both genotypes was 100 %. Detection systems have been able to analyze up to 4 copies/response in HPV33 in the multiplex. They have been able to detect integrated (I) and mixed (Z) forms of HPV, which present an increased risk of cervical intraepithelial lesions followed by progression to CCa. I form was found in 67.5 % and Z in 20 % of samples in HPV33. For HPV51 haven't been detected any samples. Detection systems have been applied only to hrHPV HPV33 and HPV51, which are minimally represented in the Czech population. These tests would be right for further investigation of other hrHPV. At the same time, much large number of samples should be examined in women over 30 years old in order to design the detection systems considered for HPV screening.

Keywords: cervical carcinoma, the HPV test, real-time PCR
Number of pages: 55
Number of appendices: 6
Language: Slovak

Prehlasujem, že som predloženú diplomovú prácu na tému *Validácia genotypizácie HPV33 a HPV51 v cervikálnych steroch* vypracovala samostatne pod odborným vedením Mgr. Hany Jaworek, za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

.....
Júlia Martinková

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať vedúcej diplomovej práce Mgr. Hane Jaworek za cenné rady a pripomienky pri vypracovaní predloženej diplomovej práce. Taktiež by som sa chcela úprimne poďakovať svojim rodičom za silnú dôveru a obrovskú podporu v priebehu celého štúdia.

Obsah

1	ÚVOD A CIELE PRÁCE.....	7
2	ĽUDSKÝ PAPILOMAVÍRUS.....	8
3	VZNIK A VÝVOJ CERVIKÁLNEHO KARCINÓMU.....	10
4	SÚČASNÉ PRÍSTUPY DIAGNOSTIKY.....	13
4.1	Cytologické vyšetrenie	14
4.2	Co- testovanie	15
4.3	Metódy detekcie HPV.....	16
4.3.1	Štandardizované porovnávacie testy.....	19
4.3.2	HPV testy plne validované podľa Meijerovho protokolu.....	20
4.3.3	Triážové testy	21
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	25
5.1	Materiál, pomôcky a prístrojové vybavenie	27
5.1.1	Použité chemikálie.....	27
5.1.2	Použitý biologický materiál	27
5.1.3	Použité pomôcky a prístrojové vybavenie	27
5.2	Zloženie roztokov	28
5.3	Vzorky patientských cervikálnych sterov	28
5.4	Použité metódy a pracovné postupy	29
5.4.1	Navrhnutie primerov pre genotypy HPV33 a HPV51	29
5.4.2	Overenie funkčnosti primerov	29
5.4.3	Stanovenie limitu detekcie a linearity assaye	30
5.4.4	Real-time PCR.....	31
5.4.5	Simulácia reálnej vzorky DNA	32
5.4.6	Test krížovej reaktivity (<i>cross reactivity</i>).....	33
5.4.7	Analýza patientských vzoriek.....	34
6	VÝSLEDKY	35
7	DISKUSIA	38
8	ZÁVER	39
	Zoznam použitej literatúry	40
	Zoznam skratiek	49
	Prílohy.....	51

1 ÚVOD A CIELE PRÁCE

Onkogénne ľudské papilomavírusy spôsobujú celosvetovo štvrtý najčastejší typ rakoviny u žien – cervikálny karcinóm. Každý rok pribudne približne 530 tisíc nových prípadov a 270 tisíc žien na toto ochorenie umiera. K približne 85 % úmrtí na cervikálny karcinóm dochádza v rozvojových krajinách, najmä v Strednej a Južnej Amerike, Karibiku, v subsaharskej Afrike a južnej Ázii (Small *et al.*, 2017). V Českej republike je diagnostikovaných 1 016 prípadov ročne a 315 žien na toto ochorenie umiera (Bruni *et al.*, 2017).

Medzi ciele diplomovej práce patrilo vypracovanie literárnej rešerše na tému metódy detekcie ľudského papilomavírusu so zameraním na rozlíšenie žien s vysokým rizikom vzniku cervikálneho karcinómu a žien s tranzientnou HPV infekciou. Na podrobnejšie informácie o taxonómii, organizácii genómu a jeho samotnej integrácii do ľudského genómu je zameraná bakalárska práca: *Formy HPV infekcie u žien s rizikom cervikálneho karcinómu*. Upríamená pozornosť bola na prevalenciu/incidenciu, rizikové faktory, samotnú prevenciu a rozlíšenie cervikálnych prekarceróz podľa cytologického a histologického vyšetrenia. Jednotlivé podkapitoly načrtli priebeh screening-u v jednotlivých štátoch Európy a možnosti detekcie HPV (Martinková, 2016), ktoré sú bližšie popísané v predloženej diplomovej práci.

Experimentálna časť spočívala v navrhnutí primerov a prób pre *E2* a *E6* gény HPV33 a HPV51 pre detekciu týchto genotypov pomocou multiplex real-time PCR. Najprv bola overená funkčnosť detekčných systémov na troch HPV33 a HPV51 pozitívnych vzorkách. Potom bola vylúčená krížová reaktivita s ďalšími HPV genotypmi so stanovením limitu detekcie testov. Následne boli nové detekčné systémy použité k vyšetreniu všetkých dostupných HPV33 a HPV51 pozitívnych vzoriek. Zo získaných dát bola vypočítaná senzitivita a špecificita novo navrhnutých detekčných metód.

2 ĽUDSKÝ PAPILOMAVÍRUS

Ľudský papilomavírus (HPV; *human papillomavirus*) bol identifikovaný ako hlavný etiologický faktor vzniku cervikálneho karcinómu (CCa; *cervical cancer*). Je schopný infikovať epidermálne alebo mukózne epiteliárne bunky, ktoré umožňujú proliferáciu buniek (zur Hausen, 2002). Tento pomerne malý, neobalený vírus tvaru ikosaedrálnej kapsidy s priemerom 55 nm je zaradený do čeľade *Papillomaviridae*, ktorá predstavuje veľmi heterogénnu skupinu s viac ako 200 druhmi HPV vírusov. Klasifikujú sa podľa onkogénneho potenciálu na vysoko- (hrHPV) a nízkorizikové typy (lrHPV; tab. 1) (Burd, 2003; Muñoz *et al.*, 2003). HrHPV genotypy ako HPV16 a 18 sú spojené so vznikom cervikálnych intraepiteliárných lézií (CIN), CCa okrem toho i karcinómu vulvy, vagíny, penisu, konečníku, pokožky, ústnej dutiny, orofarynxu a larynxu (Ondryášová *et al.*, 2013). LrHPV typy ako HPV6 a 11 sú späté s vznikom genitálnych bradavíc (kondylómy), rekurentnou respiračnou papilomatózou a léziami nižších štádií CIN (Trottier & Franco, 2006; Omland *et al.*, 2014).

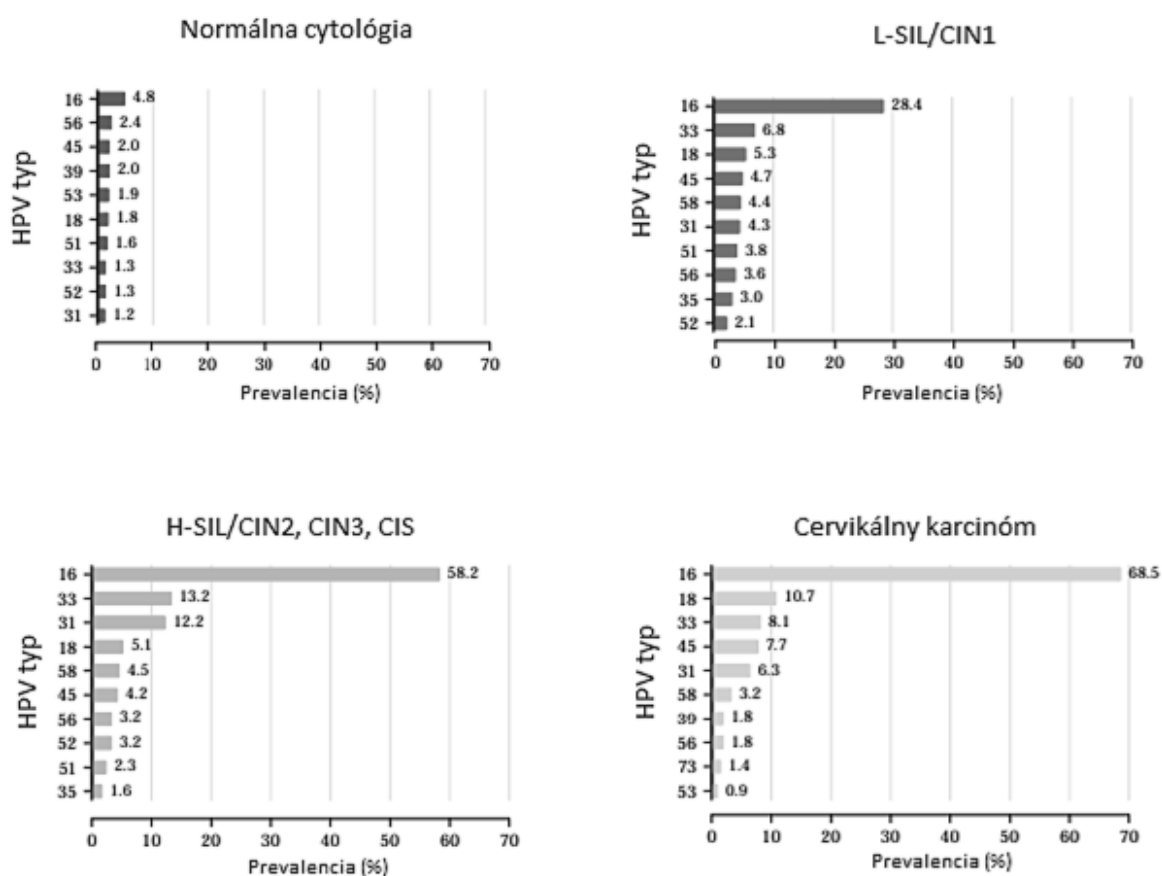
Tab. 1: Klasifikácia HPV podľa onkogénneho potenciálu (svet).

klasifikácia	HPV podtyp
onkogénne (hrHPV)	16, 18, 31, 33 , 35, 39, 45, 51 , 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
pravdepodobne onkogénne HPV	26, 53, 66
neonkogénne (lrHPV)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
HPV s neurčitým rizikom	34, 57, 83

(prevzaté z Ondryášová *et al.*, 2013)

HPV16 a HPV18 sa vyskytujú v najväčšom zastúpení spomedzi všetkých HPV. Celosvetová prevalencia je zostupne v poradí HPV16 (55,1 %), HPV18 (14,3 %), HPV45 (5 %), HPV33 (4,2 %), HPV58 (3,9 %), HPV31 (3,5 %), HPV52 (3,5 %), HPV35 (1,7 %), HPV39 (1,5 %) a HPV59 (1,4 %) (Kim & Kim, 2017). Ich výskyt v Českej republike sa v porovnaní so svetom príliš nelíši (Obr. 1), najmä u vysokorizikových HPV16 (68,5 %) a HPV18 (10,7 %). Najvyššia prevalencia hrHPV 37 % je už žien vo veku do 25 rokov. So zvyšujúcim sa vekom nad 61 rokov dochádza k zníženiu prevalencie na 9 %. Predložená práca je zameraná na dva hrHPV: HPV33 a HPV51. Prevalencia HPV33 je v Českej republike 8,1 % (5,2-12,5 %), HPV51 0,0 % (0,0-0,7 %) (Bruni *et al.*, 2017; Tachezy *et al.*, 2013).

Genóm vírusu pozostáva z jedinej molekuly DNA (7 900 bp), uložené v kapside, kondenzované vďaka interakciám s proteínmi podobným histónom. HPV genóm môžeme rozdeliť do troch oblastí. **Nekódujúca dlhá kontrolná oblasť** (LCR; *long control region*) o veľkosti 400-1 000 bp, zložená zo skorého promotora p97, zosilňovačov a tlmiacich sekvencií. Regulujú replikáciu DNA riadením transkripcie otvoreného čítacieho rámca (ORF; *open reading frame*). Práve v tejto oblasti dochádza k najväčšiemu počtu zmien v HPV genóme. **Skorá oblasť ORF** tvorená génmi *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* a *E7* zabezpečuje vírusovú replikáciu a onkogenicitu. **Neskorá oblasť ORF** obsahuje gény kódujúce štruktúrne proteíny L1 a L2 (Burd, 2003).



Obr. 1: Prevalencia (v %) desiatich najviac sa vyskytujúcich hrHPV v Českej republike. Porovnanie prevalencie hrHPV u žien s normálnou cytológiou (bez nálezu zmien) a s postupnou progresiou ochorenia. Vysvetlenie skratiek podľa cytologického vyšetrenia: CIN1-3 (cervikálne intraepiteliárne neoplázie 1. až 3. stupňa, CIS (karcinóm *in situ*); podľa histologického vyšetrenia: L-SIL (ľahké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie), H-SIL (ťažké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie) (prevzaté a upravené z Bruni *et al.*, 2017).

3 VZNIK A VÝVOJ CERVIKÁLNEHO KARCINÓMU

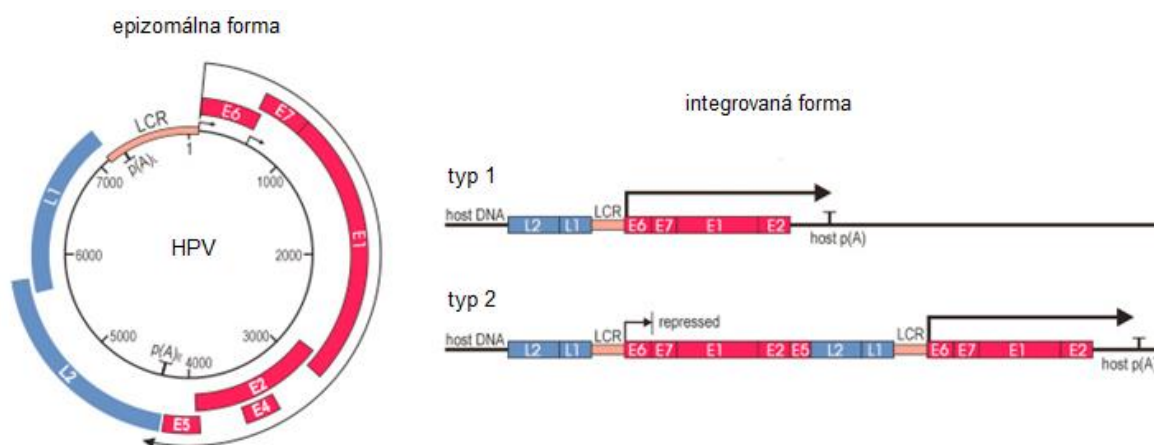
Za samotným počiatkom vzniku CCa stojí pretrvávajúca HPV infekcia. Replikačný cyklus HPV začína vstupom vírusu do bazálnych buniek epitelu (*stratum germinativum*) hostiteľského organizmu (Burd, 2003). Prienik vírusu je umožnený pomocou proteoglykánového receptora heparan sulfátu na bunkovom povrchu (Giroglou *et al.*, 2001; Fisher, 2015). Pri perzistentnej infekcií dochádza k integrácií HPV v rizikových oblastiach chromozómových translokácií, ale aj v transkripčne aktívnych oblastiach hostiteľského genómu. Vírus takto ovplyvní expresiu vlastných génov aj génov hostiteľského organizmu (Schmitz *et al.*, 2012). Integrovaná forma bola detekovaná vo viac ako 80 % HPV pozitívnych vzoriek CCa (McBride & Warburton, 2017).

Vírusové regulačné gény *E1* a *E2* podporujú počiatočnú replikáciu virálnej HPV DNA vo forme extrachromozomálneho epizómu o nízkom počte kópií cca 50 - 300 kópií na bunku (Obr. 2). V tejto fáze sa HPV genóm rozdelí do dcérskych buniek, kde už dochádza k replikácií vysokého množstva vírusových častíc s postupným diferencovaním do vyšších vrstiev epitelu. Vírusové častice sa hromadia v jadre. Kompletné virióny sa uvoľnia z odumretých buniek hornej vrstvy epitelu (Obr. 3) (McBride & Warburton, 2017; Shanmugasundaram & You, 2017; Burd, 2003).

V prípade genitálnych bradavíc je replikácia spojená s proliferáciou vo všetkých vrstvách epitelu okrem bazálnej vrstvy. Bunečná proliferácia v bazálnej vrstve vedie ku genómovej nestabilite a malígnej transformácií smerujúcej k viacstupňovému procesu vzniku CCa. Progresia do tohto štádia trvá 10 až 20 rokov (Burd, 2003).

Pri procese integrácie dochádza k narušeniu funkcie a eliminácii expresie génu *E2* skorej oblasti ORF, ktorá vedie k nadmernej regulácií a expresii onkoproteínov E6 a E7. Tieto onkoproteíny deaktivujú tumorsupresorové proteíny p53 (tumorsupresorový proteín) a pRB (retinoblastómový proteín) s následnou stratou kontroly nad bunečným cyklom (BC) (Vega-Peña *et al.*, 2013; Shanmugasundaram & You, 2017). Onkoproteín E6 spôsobuje degradáciu p53, ktorý v prípade poškodenia DNA zastavuje bunku v G1 fáze. Onkoproteín E7 interaguje s defosforylovanou formou pRB, ktorá vzniká v priebehu anafázy. Narušuje vzájomné pôsobenie medzi pRB s transkripčným faktorom E2F-1. Následkom je uvoľnenie E2F-1 a transkripcia génov, ktorých produkty sú potrebné na vstup bunky do ďalšej fázy BC. Onkoproteíny E6 a E7 indukujú deaktiváciu

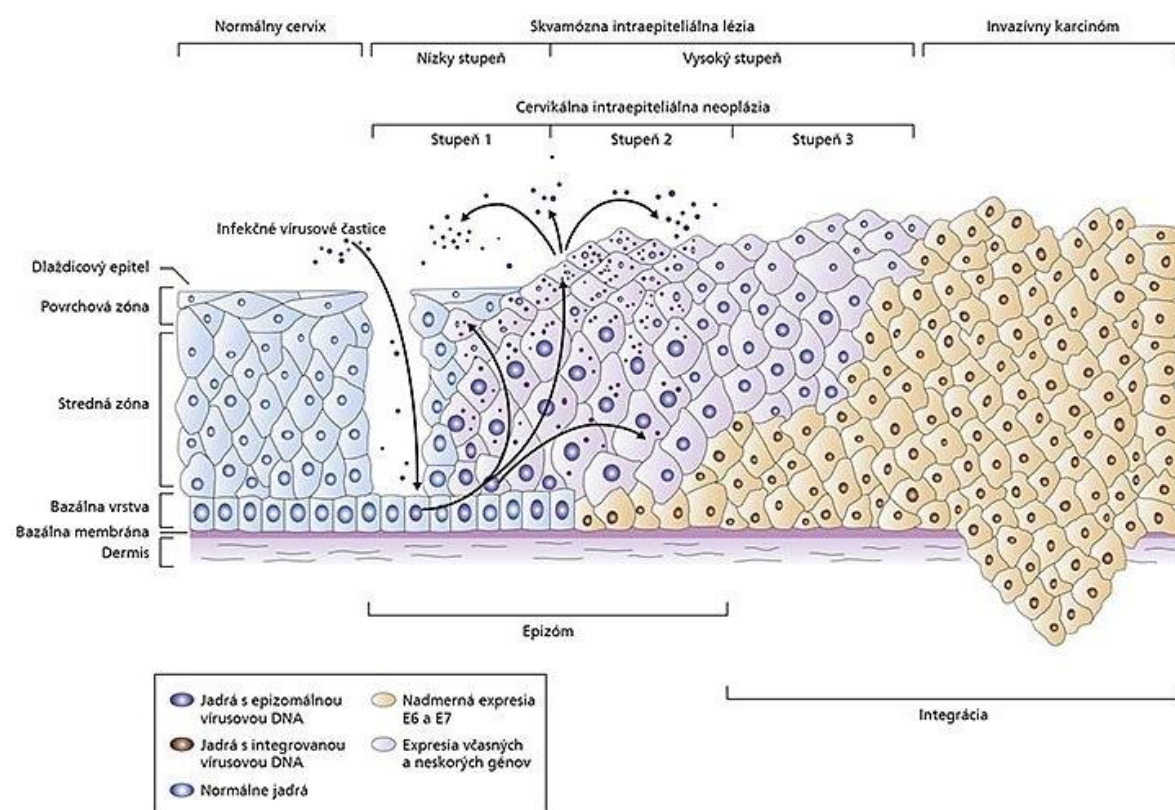
tumorsupresorov pRB a p53 pomocou ubiquitin ligázy. Medzi ďalšími dôsledkami expresie onkoproteínov je udržiavanie proliferáčnej aktivity, vyhnutie sa rastovým supresorom a indukcia angiogenézy. HrHPV onkoproteíny E6 a E7 majú vyššiu afinitu k p53 a pRB v porovnaní s IrHPV, zapríčinia tak väčšie a rozsiahlejšie poškodenia DNA, ktoré už nie je možné opraviť (Burd, 2003; Durzynska *et al.*, 2017).



Obr. 2: Porovnanie cirkulárneho HPV genómu (epizomálna forma) s HPV genómom po integrácii do ľudskej DNA. (Vľavo) kompletný HPV genóm so všetkými tromi funkčnými oblasťami (viz. 2. kapitola). Epizomálna forma HPV DNA je detekovaná prevažne u tranzientnej/prechodnej HPV infekcie a L-SIL. (Vpravo) sú znázornené dva možné typy integrácie HPV do ľudskeho genómu. Po integrácii vírusu sú možné 2 formy integrovania: typ 1 s jednou kópiou HPV DNA a typ 2 s integráciou početnejších kópií vírusovej DNA. U typu 1 dochádza k integrácii jednej kópie HPV genómu. Tento typ vykazuje aktívnu expresiu onkoproteínov E6 a E7 prostredníctvom stabilnejších transkriptov, narušením regulačného ORF aktivitou E2 génu. U typu 2 je do ľudskeho genómu integrovaná viac než jedna kópia HPV genómu. Všetky kópie až na poslednú kópiu na 3' konci konkatemeru (dlhá kontinuálna DNA molekula o vysokom obsahu kópií) majú hypermetylevanú LCR a sú teda expresne neaktívne. Vyskytuje sa najmä v spojitosti s H-SIL a CCa (prevzaté a upravené z Durzynska *et al.*, 2017).

CCa je výsledkom progresie cervikálnych intraepiteliálnych lézií (CIN1, 2 a 3) (Obr. 3). CIN1 indikuje sexuálne prenosnú hrHPV infekciu, zatiaľ čo ďalšie 2 štádia sú skutočným prekursorom CCa. Pravdepodobnosť progresie medzi CIN1 v CIN2 je 1 %, pričom riziko progresie z CIN2 do CIN3 je 16 % v priebehu 2 rokov a 25 % v priebehu 5 rokov (Burd, 2003). Väčšina HPV infekcií je asymptomatická a prechodná (70-90 %), organizmus sa s nimi spontánne vysporiada do 1-2 rokov (Kim & Kim, 2017). Napriek tomu 10-20 % HPV infekcií je perzistentných, ktoré

môžu viesť k vzniku CIN lézií s prípadnou progresiou v rôzne typy rakoviny (Shanmugasundaram & You, 2017). Na vzniku CCa sa podieľajú aj iné faktory: fajčenie cigariet, dlhodobé užívanie hormonálnej antikoncepcie, koinfekcie s vírusom herpes simplex typu 2 alebo vírusom ľudskej imunodeficiencie (HIV) (Small *et al.*, 2017). Včasná detekcia HPV a následná liečba môže zabrániť vzniku tohto ochorenia (Burd, 2003).



Obr. 3: Progresia HPV infekcie do cervikálneho karcinómu. Po infekcií HPV sa vírus dostáva k bazálnym bunkám cervikálneho epitelu, kde sú exprimované skoré HPV gény a replikuje sa epizomálna forma HPV DNA (fialové jadrá). Po odumretí buniek v hornej vrstve epitelu dochádza k uvoľneniu viriónov iniciujúcich novú infekciu. Progresia CIN do invazívneho karcinómu je zapríčinený integráciou HPV genómu do hostiteľských chromozómov (červené jadrá) súvisiace so stratou/narušením funkcie génu *E2*, ktorý reguluje expresiu onkoproteínov *E6* a *E7* (prevzaté z https://www.alphamedical.sk/files/styles/content_image_centered/public/2016_01_onkogenne_virusy-obr1.jpg?itok=yoIDYWb6, stiahnuté 27.10.2017; Woodman *et al.*, 2007).

4 SÚČASNÉ PRÍSTUPY DIAGNOSTIKY

Význam detekcie a diagnostiky HPV smerujú k veľkému pokroku v primárnej a sekundárnej prevencii vzniku CCa. Primárna prevencia zahŕňa vývin vakcín zameraných na najrozšírenejšie hrHPV (Wentzensen *et al.*, 2016). Profylaktické vakcíny Silgard/Gardasil® (Merck, Sharp & Dohme) a Cervarix® (GlaxoSmithKline) dokázali za posledné desaťročie výrazne znížiť výskyt CCa (Shanmugasundaram & You, 2017). Štvorvalentná vakcína Silgard je zameraná proti HPV6, 11, 16 a 18 a vakcína Cervarix proti HPV16 a 18. Obidve obsahujú neinfekčné kapsidové proteíny (vírusu podobné častice), ktoré chránia len proti vakcinárnym HPV genotypom (Stillo *et al.*, 2015; Markowitz *et al.*, 2007). Nedávno bola na trh uvedená novalentná vakcína Gardasil® 9 proti 7 hrHPV (16, 18, 31, 33, 45 a 58) zodpovedajúcim za 90 % CCa a 2 lrHPV (6, 11) spôsobujúce 75-90 % genitálnych bradavíc (Joura *et al.*, 2015; Yanofsky *et al.*, 2012).

Sekundárna prevencia CCa zahŕňa screening prostredníctvom cytologického vyšetrenia (Pap test, *Papanicolaou test*) a detekcie HPV testami. Spočiatku boli testy detekujúce HPV DNA alebo RNA schválené na testovanie prípadov len s cytologickým nálezom: atypických dlaždicových buniek nejasného významu (ASC-US). Prelom nastal v USA v apríli 2014, kde bol cobas® 4800 HPV Test schválený Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA; *the US Food and Drug Administration*) pre primárny screening HPV žien ≥ 30 rokov (Wentzensen *et al.*, 2016; ACS, Simon, 2014).

V Českej republike je screening založený na Pap teste doplneným HPV diagnostikou len v prípade ASC-US (cca 4 %) (Ondryášová *et al.*, 2013). V rámci prevencie je predovšetkým mladým ženám doporučené očkovanie a pravidelná účasť na cervikálnom screening-u raz ročne. Z dôvodu nízkej účasti žien na cervikálnom screening-u začali zdravotné poisťovne od roku 2014 adresne pozývať ženy, ktoré sa nezúčastnili pravidelných prehliadok. Žiaľ, ani to nevedlo k úspešnej organizovanej účasti, ktorá je v súčasnosti len okolo 50 % (Sláma, 2017; Tachezy *et al.*, 2013). Ďalšie možnosti pre ženy nezúčastňujúce sa screening-u je zakúpenie HPV vyšetrenia prostredníctvom samoodberovej sady Evalyn® brush (Rovers medical) v hodnote 1 199Kč/45 € (van Baars *et al.*, 2012; <http://www.vyzkumrakoviny.cz/produkt/samoodberovy-hpv-test/>).

V súčasnosti sa v praxi využívajú tri alternatívy screening-u CCa: cytologický screening, detekcia HPV testami, prípadne paralelné použitie cytológie a HPV diagnostiky (co-testovanie) (Wentzensen *et al.*, 2016).

4.1 Cytologické vyšetrenie

Cytologické vyšetrenie je najpoužívanejšia metóda založená na morfológickom hodnotení exfoliovaných buniek zo steru krčka maternice (tab. 2). Pomocou Pap testu odlišuje bunkové zmeny typické pre CIN alebo malignitu od vzoriek bez morfológických zmien. Avšak niektoré cytologické abnormality bývajú nejednoznačné – ASC US, ASC-H (Markowitz *et al.*, 2007). Uplatnením v praxi došlo k podstatnému zníženiu výskytu CCa, najmä v krajinách s organizovaným screening-om (Koliopoulos *et al.*, 2017; Wentzensen *et al.*, 2016).

V Európe bývajú ženy vo veku 21-65 rokov pozývané na testovanie každé 3 roky, v prípade Českej republiky je to raz ročne (Sadovský, 2014; Ondryášová *et al.*, 2013). Ročný interval nie je doporučený ako návrh organizovaného screeningu všetkých krajín Európy, neprináša väčšiu výhodu zníženia rizika. Naopak zvyšuje finančné náklady s ním spojené (Sadovský, 2014). Najideálnejší návrh cytologického screening-u by bol odporúčaný každé 3 roky a započal by už od 21 roku (Hoste *et al.*, 2013). U žien starších ako 30 rokov je doporučené spoločné testovanie s HPV diagnostikou (ACOG, 2012).

Tab. 2: Cytologická a histologická klasifikácia cervikálnych prekarceróz.

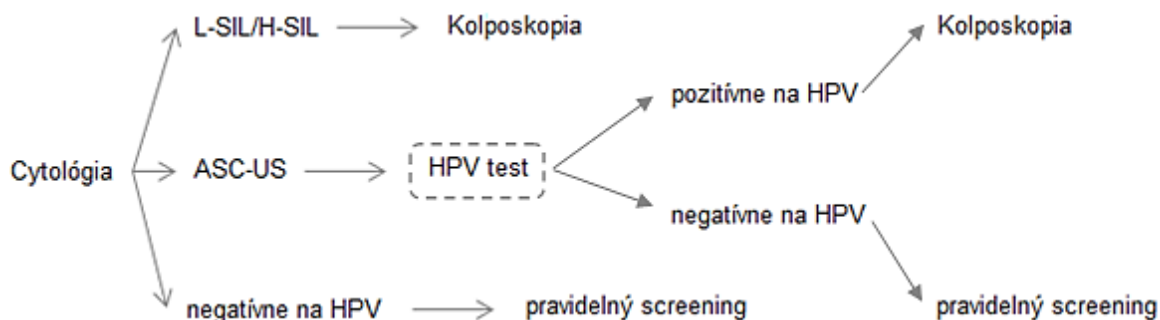
Cytologická klasifikácia (pre screening)		Histologická klasifikácia (pre diagnostiku)	
Pap test	Bethesda system	CIN	klasifikácia podľa WHO
trieda I.	normálne	atypické	normálne
trieda II.	ASC-US, ASC-H	atypické	atypické
	L-SIL	CIN1 zahrňujúca ploché kondylómy	koilocytóza
trieda III.	H-SIL	CIN2	mierna dysplázia
	H-SIL	CIN3	závažná dysplázia
trieda IV.	H-SIL	CIN3	karcinóm <i>in situ</i> (CIS)
trieda V.	invazívny karcinóm	invazívny karcinóm	invazívny karcinóm

(prevzaté a upravené z WHO, 2014)

* vysvetlenie skratiek: ASC-US: atypické dlaždicové bunky nejasného významu; ASC-H: atypické dlaždicové bunky nevylučujúce prítomnosť H-SIL; CIN: cervikálna intraepiteliárna neoplázia; L-SIL: ľahké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie; H-SIL: ťažké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie (WHO, World Health Organization, 2014).

Cytologické vyšetrenie dosahuje vysokú špecificitu (SP) 98-99 %, pre ASC-US a horšie 96,8 %, pre L-SIL a horšie 98,8 %. Naopak dosahuje nízku senzitivitu (SE) len okolo 60-75 %, pre ASC-US len okolo 53,7 %, ktorá vedie k zvýšenému množstvu falošne negatívnych vzoriek (FN) a neschopnosti zachytiť väčšinu prekarcerózných lézií. Nízka SE jedného vyšetrenia je obzvlášť problém u žien, ktoré nenavštevujú pravidelne gynekologické prehliadky (WHO, 2002; Agorastos *et al.*, 2015; Turyna *et al.*, 2010; Valentine *et al.*, 2016).

HPV pozitívne vzorky s ASC-US tvoria väčšinu abnormálnej cytológie, predstavujú bunkové zmeny, ktoré ale nemusia byť spojené s CIN. Napriek tomu sú vystavené zvýšenému riziku vzniku H-SIL/CCa a nemajú byť umiestnené do pravidelných screening-ových intervalov. V prípade ASC-US je doporučené podstúpenie HPV testovania (Obr. 4). Nie je efektívne aby ženy s ASC-US hneď podstupovali kolposkopiu, len kvôli zvýšenému riziku, bez ďalšieho testovania (Schmitt *et al.*, 2006; Wentzensen *et al.*, 2016; Ondryášová *et al.*, 2013).



Obr. 4: Screening-ový algoritmus schválený v Českej republike a aplikovaný v praxi. Pacientky negatívne na HPV sa vrátia k pravidelnému screening-u raz ročne. Ženy s L-SIL/H-SIL sú odvolané na kolposkopiu, ženy s ASC-US sú podrobené HPV testovaniu. V prípade positivity sú odvolané na kolposkopiu, pri negatívnom výsledku sú zaradené do pravidelných screening-ových prehliadok (prevzaté a upravené z Cox *et al.*, 2013, stiahnuté 15.4.2018).

4.2 Co- testovanie

Spoločné (co-) testovanie spočívajúce v kombinácií HPV DNA s Pap testom je odporúčané ženám vo veku 30-65 rokov (ACOG, 2012). Rôzne publikácie podporujú skutočnosť, že výsledok 2 nezávislých testov poskytuje väčšiu ochranu pred CCa ako jeden. HPV DNA testy ponúkajú vyššiu citlivosť a cytológia zas špecifickosť, ich kombinácia by bola v screening-ovom algoritme najideálnejšia a najbezpečnejšia (Valentine *et al.*, 2016). Ženy by tak boli

testované každých 5 rokov v prípade negatívneho HPV testu i cytológie (Cox *et al.*, 2013). V súčasnej dobe cena nákladov na HPV testy dramaticky klesla na úroveň cytologických vyšetrení, napriek tomu použitie obidvoch metód by zvýšilo finančné náklady (Koliopoulos *et al.*, 2017).

Podľa Americkej spoločnosti pre výskum rakoviny (ACS; *American Cancer Society*) je spoločné testovanie zbytočné a viac by preferovala len HPV testovanie. Na základe týchto dôkazov by mala byť upriamená pozornosť práve na HPV testovanie ako hlavný primárny screening HPV (Dijkstra *et al.*, 2014) v kombinácii s tzv. triážovými testami, ktoré by boli schopné rozlíšiť ženy hrHPV+ s vysokým rizikom vzniku CCa (Valentine *et al.*, 2016).

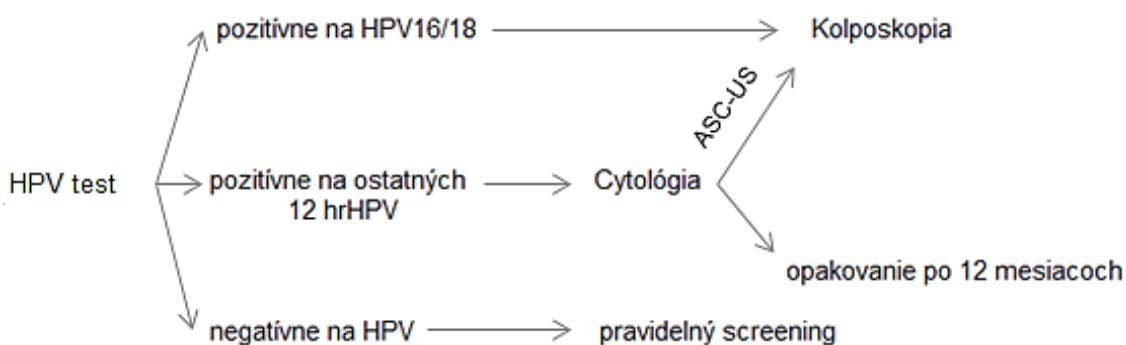
4.3 Metódy detekcie HPV

Klinicky validované HPV DNA/RNA testy sú výhodné pre diagnostiku hrHPV. Ich vysoká citlivosť (až 100 %) (WHO, 2002) má hlavný vplyv na predĺženie intervalov screening-u oproti cytológií (Hoste *et al.*, 2013). Podľa Ronco *et al.*, 2014 štyri európske štúdie Swedescreen (Švédsko), POBOSCAM (Holandsko), ARTISTIC (Anglicko) a NTCC (Taliansko) potvrdili nižší výskyt CCa po 5-tich rokoch po negatívnom HPV teste v porovnaní s cytológiou po 3 rokoch. HPV screening po 5-tich rokoch by tak mohol znížiť počet kolposkopických vyšetrení s biopsiou a zároveň by sa znížili finančné náklady (Naucler *et al.*, 2007; Bulkman *et al.*, 2007; Kitchener *et al.*, 2009; Ronco *et al.*, 2010). Štúdia od Berkhof *et al.* uviedla možnosť predĺženia HPV testovania až na 6-8 rokov, bez zvýšeného rizika vzniku CCa, ale len pre hrHPV negatívne vzorky. HrHPV pozitívne ženy s normálnou cytológiou majú 5,2% riziko vzniku CIN3+, príliš vysoké na oddialenie sledovania na 3-5 rokov, ale naopak príliš nízke na podstúpenie okamžitej kolposkopie (Dijkstra *et al.*, 2014).

HPV testy sú schopné detekovať prítomnosť HPV v takmer 100 % prípadov invazívnych CCa, v 75-90 % u prekursorových lézií (L-SIL/CIN1, CIN2/3, H-SIL) a v 50 % ASC-US (WHO, 2002). Zároveň dosahujú vysokú SP až 96 % pre ASC-US, pre L-SIL 93 % a pre H-SIL 83 % (Mureşan *et al.*, 2016). HPV testy sú ale menej špecifické než cytológia, to predstavuje riziko zvýšeného množstva falošne pozitívnych výsledkov (FP) (Agorastos *et al.*, 2015). Detekujú i netransformujúcu prechodnú/transientnú HPV infekciu (Ondryášová *et al.*, 2015), ktorá by ale mohla byť v najbližších dvoch rokoch eliminovaná (Kim & Kim, 2017). Preto je doporučené aplikovať tieto HPV testy až pre ženy staršie ako 30 rokov, u ktorých

by už nebola prítomná tak vysoká prevalencia tranzientných HPV infekcií (Hoste *et al.*, 2013) a došlo by k zníženiu počtu FP vzoriek a nepotrebných biopsií a kolposkopií (Meijer *et al.*, 2009).

Aplikovanie HPV testu ako primárny screening-u HPV ponúka kvalitnejší screeningový algoritmus pre ženy staršie ako 30 rokov v porovnaní so samotnou cytológiou (Hoste *et al.*, 2013). Cobas® 4800 HPV Test, schválený FDA pre primárny screening HPV, odporúča triedenie HPV pozitívnych žien podľa Obr. 5. Na základe týchto poznatkov je potrebné zabezpečiť lepší primárny screeningový algoritmus v Českej republike, ktorý by bol uplatnený v praxi. Umožnil by presnejšiu diagnostiku hrHPV pozitívnych pacientiek. Tie by v prípade rizika, nemuseli hneď podstupovať kolposkopické vyšetrenie v prípade H-SIL alebo pretrvávajúceho L-SIL, ako je tomu v súčasnosti (Obr. 4) (Wentzensen *et al.*, 2016).



Obr. 5: Potenciálny algoritmus použitia HPV testu: napr. cobas® 4800 HPV Test (Roche) pre primárny screening HPV. Pacientky negatívne na HPV sa vrátia k pravidelnému screening-u v 3-ročných intervaloch. Ženy pozitívne na HPV16/18 sú odvolané priamo na kolposkopiu. Tie, ktoré sú pozitívne na iné hrHPV, sú znovu testované. V prípade positivity na ASC-US/H-SIL sú taktiež odvolané na kolposkopické vyšetrenie, vzorky s normálnou cytológiou sú znovu testované po 12 mesiacoch (prevzaté a upravené z Wentzensen *et al.*, 2016).

V súčasnosti sú testy pre screening HPV validované podľa tzv. Meijerovho protokolu. Štandardizované testy: Hybrid Capture II test (Qiagen, USA) a GP5+/6+ PCR EIA (Diassay, Holandsko) sú navrhnuté ako kritérium pri overovaní ďalších nových HPV testov, ktoré ponúknu vysokokvalitný screening HPV (Carozzi *et al.*, 2016; Dijkstra *et al.*, 2014). Opakovane preukázali klinickú SE 90-95 % na detekciu \geq CIN2 a SP najmenej 98 % u žien vo veku starších 30 rokov (Meijer *et al.*, 2009).

Podľa *Meijer et al.* potenciálny HPV test vhodný na primárny screening HPV by mal spĺňať nasledovné kritéria. Test by mal mať klinickú senzitivitu pre \geq CIN2 najmenej 90 % (citlivosť HC2 97,3 %, GP5+/6+ PCR EIA 94,1 %). Vysoká SE sa prejavuje vyššou negatívnou prediktívnou hodnotou HPV testu, ktorá umožňuje predĺžiť screening-ový interval. Zároveň má mať potenciálny HPV test klinickú špecificitu najmenej 98 % u žien starších 30 rokov (špecificita HC2 93,2 %, GP5+/6+ PCR EIA 97,3 %). Vysoká SP obmedzí počet FP výsledkov. Väčšina kandidátnych testov hrHPV sa v klinickej SP a SE líši. Tieto rozdiely sú dané do značnej miere rozdielom v detekcii perzistentných HPV infekcií charakterizovaných nízkym *viral load*. Klinická SP HC2 sa zvyšuje čiastočne kvôli zníženej krížovej reaktivite s IrHPV. Kandidátny test by mal vykazovať vnútrolaboratórnu reprodukovateľnosť a medzilaboratórnu zhodu s mierou spoľahlivosti najmenej 87 % (v porovnaní s HC2 a GP5+/6+ PCR EIA bola medzilaboratórna zhoda najmenej 92 %) (*Meijer et al.*, 2009; *Snijders et al.*, 2003).

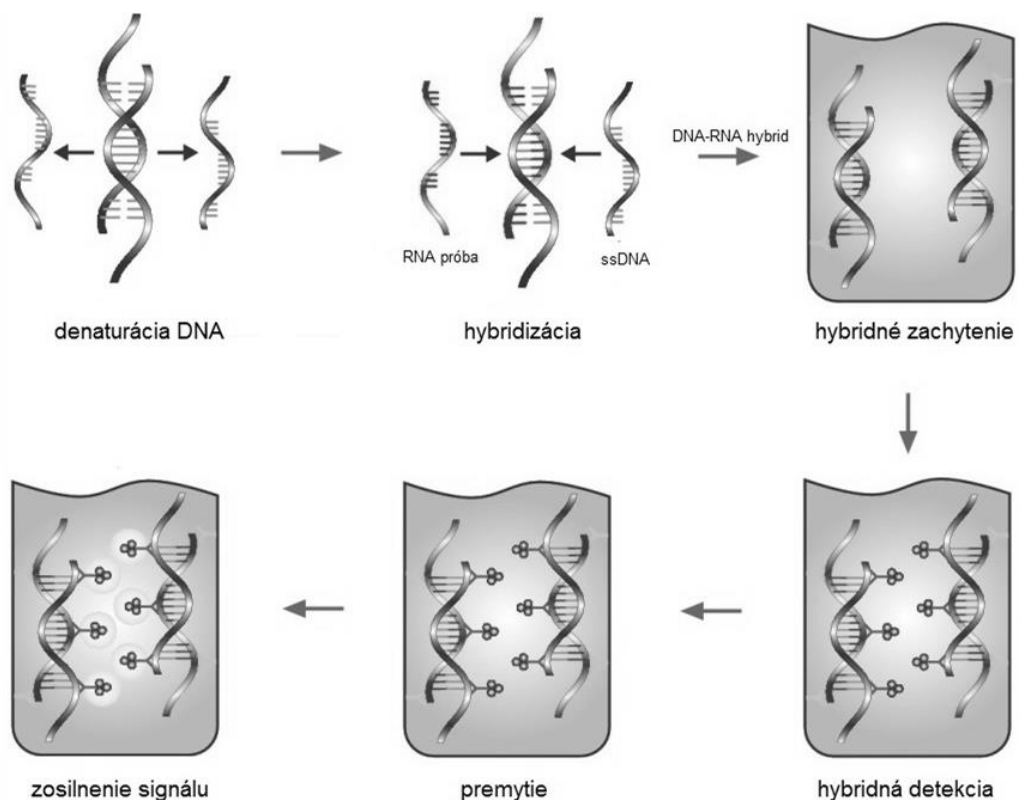
Všetky tieto kritériá spĺňajú HPV testy: cobas[®] 4800 HPV Test (Roche, v USA už schválený FDA), PapilloCheck HPV-screening test (Greiner Bio-One), Abbott RealTime hrHPV test (Abbott Molecular), BD Onclarity HPV test (Onclarity), HPV-Risk Assay test (Self Screen) a test Aptima HPV (Hologic) založený na detekcii mRNA. Tieto testy môžu byť teda doporučené ako primárne screening-ové metódy. Testy, ktoré čiastočne spĺňajú požiadavky byť aspoň tak presné ako HC2 a GP5+/6+ PCR EIA sú Cervista HPV HR test (Hologic), GP5+/6+ PCR LMNX (Diassay). Pre tieto metódy bude ale potrebné previesť ďalšie klinické štúdie (*Arbyn et al.*, 2015; *Szarevski et al.*, 2012).

V súčasnosti sa pracuje na tzv. triážových testoch, určených k výberu hrHPV+ žien s vysokým rizikom vzniku CCa, ktoré by sa mali podrobiť kolposkopií (*Schiffman et al.*, 2015, *Wentzensen et al.*, 2016). Ako ďalší potenciálny marker diagnostiky hrHPV predstavuje detekcia zvýšených hladín mRNA pre onkoproteíny E6/E7, ktoré vplyvom integrácie HPV a následnej overexpresie zapríčiňujú nekontrolovanú proliferáciu a genetické zmeny (*Dijkstra et al.*, 2014).

Molekulárne metódy detekcie HPV DNA/RNA rozlišujeme na neamplifikačné (napr. Southern blotting a *in situ* hybridizácia) a amplifikačné, ktoré sú v oblasti klinického výskumu využívané častejšie. Amplifikačné metódy môžeme rozdeliť na metódy založené na zosilnení signálu napr. test hybridného zachytenia II (Hybrid Capture II test; HC2) alebo amplifikácie cieľovej nukleovej kyseliny (NK) založenej na princípe PCR napr. GP5+/6+ PCR EIA (*Schmitt et al.*, 2006).

4.3.1 Štandardizované porovnávacie testy

Hybrid Capture II test (HC2) bol schválený FDA ako prvý referenčný test pre ďalšie potenciálne HPV testy (Meijer *et al.*, 2009). V dnešnej dobe najrozšírenejší HPV test, ktorý je schopný detekovať až 13 hrHPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68). Táto metóda je založená na denaturácii DNA, hybridizácii s RNA próbou a chemiluminiscenčnom stanovení DNA-RNA hybridov s následnou amplifikáciou signálu pre kvalitatívnu detekciu HPV (Obr. 6). HC2 nie je priamo určený na screening celej populácie ale je pomocným riešením pri rozlišovaní IrHPV a hrHPV infekcie, najmä u žien odkázaných na kolposkopiu. Nedostatkom HC2 je krížová reaktivita sond (*cross reactivity*) prítomná u HPV6, 13 a 42 (Burd, 2003; Arbyn *et al.*, 2015; Qiagen príbalový leták; Wong *et al.*, 2012). Tento test neumožňuje špecifickú identifikáciu a genotypizáciu HPV. Nedostatok čiastočne vyriešili testy založených na PCR za použitia špecifických primerov, ktoré umožnia detekciu širšieho spektra HPV (Liao *et al.*, 2013).



Obr. 6: Schéma technológie Hybrid Capture II test (Qiagen). DNA z cervikálnych sterov je zdenaturovaná a premiešaná s pool-om RNA sondy v pufrovanom roztoku. Test umožňuje použitie dvoch RNA sond naraz alebo oddelene. Sonda A pool detekuje IrHPV a druhá sonda B pool hrHPV, ale nie je schopná rozlíšiť jednotlivé genotypy HPV (prevzaté a upravené z Qiagen príbalového letáku, 25.9.2017; Burd, 2003).

GP5+/6+ PCR EIA Test (Diassay, Holandsko) ponúka rovnaké testovanie cieľových 13 hrHPV ako HC2, navyše dokáže detekovať HPV66. S týmto genotypom bola popísaná krížová reaktivita metódy u HC2 sondy B (Meijer *et al.*, 2009). Princíp testu spočíva v amplifikácii cieľovej DNA sekvencie *L1* génu o veľkosti 150 bp prostredníctvom PCR, následne je HPV detekovaný enzýmovou imunoanalýzou (EIA). Typizácia je umožnená hybridizáciou PCR produktov so špecifickými oligonukleotidmi imobilizovanými na membránach. Detekcia je prevedená pomocou chemiluminiscenčnej reakcie (Schmitt *et al.*, 2006).

4.3.2 HPV testy plne validované podľa Meijerovho protokolu

Tieto testy spĺňajú všetky kritéria Meijerovho protokolu a mohli by byť použité pre primárny screening HPV, podobne ako cobas[®] 4800 HPV Test (Roche) (Arbyn *et al.*, 2015). Navzájom sa líšia v type amplifikácie, cieľovom géne alebo v druhu cieľovej nukleovej kyseliny (NK), zároveň sa odlišujú v čiastočnej alebo úplnej genotypizácii (resp. samostatnej genotypizácii hrHPV16 a 18) (Tab. 3). Testy sú väčšinou založené na PCR amplifikácii odlišných génov/popripade celého genómu, s určením prítomnosti HPV DNA. Pre klinickú prax sú najvýhodnejšie HPV testy schopné detekovať čo najväčší počet hrHPV podtypov. Validovaný test cobas[®] 4800 HPV Test je zároveň schopný plne automatickej izolácie DNA priamo zo vzorku, zameraný na špecifickejšiu genotypizáciu hrHPV16/18. Automatizovaný systém je schopný eliminovať prípadné chyby ľudského faktoru a zároveň vyšetriť väčší počet vzoriek (Arbyn *et al.*, 2015; Ondryášová *et al.*, 2013).

Cobas[®] 4800 HPV Test, Cervista HPV test a Abbott RealTime High Risk HPV test sú zamerané na oblasť génu *L1*, ktorá môže byť v dôsledku integrácie HPV do ľudského genómu fragmentovaná. Fragmentácia cieľovej oblasti môže viesť k zvýšenému počtu falošne negatívnych výsledkov (FN) (Arbyn *et al.*, 2015; Ondryášová *et al.*, 2013). Niektoré metódy sú založené na detekcii hrHPV *E6/E7* mRNA, ktoré slúžia ako biomarker pre PreTect HPV-Proofer (Proofer). Tento test dokáže roztriediť pacientky pozitívne na hrHPV s normálnou cytológiou aj pri zvýšenom riziku CIN2+ v prípade pozitívneho výsledku mRNA (Dijkstra *et al.*, 2014). Ako ďalšie testy využívajúce spomínaný marker sú APTIMA HPV assay, Cervista HPV test (v kombinácii s génom *L1*), BD Onclarity HPV assay a qPCR (*E6/E7*) (Arbyn *et al.*, 2015).

Použitie samotných validovaných HPV testov podľa Meijerovho protokolu nestačí na zníženie počtu FP výsledkov z prechodnej/tranzientnej HPV infekcie.

Využitie triážových testov u hrHPV+ pozitívnych pacientiek, ako doplnkových testov k HPV diagnostike, by mohli pomôcť odlíšiť ženy s prechodnou a perzistentnou HPV infekciou. Týmto spôsobom by mohlo dôjsť k zníženiu FP vzoriek (Dijkstra *et al.*, 2014).

Tab. 3: Charakteristika hrHPV testov podľa Meijerovho protokolu.

hrHPV test	NK	typ amplifikácie	cieľový gén	genotypizácia
HC2 ⁺	DNA	signálna	celý vírusový genóm	13 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) a 5 lrHPV (6, 11, 42, 43, 44)
GP5+/6+ PCR EIA ⁺	DNA	cieľová	L1	ako HC2 + HPV66
APTIMA HPV assay*	RNA	cieľová	E6/E7	HPV16, 18-45
Abbott RealTime High Risk HPV test*	DNA	cieľová	L1	16, 18 a ďalších 12 hrHPV
BD Onclarity HPV assay*	DNA	cieľová	E6/E7	16, 18, 31, 45, 51, 52; 33-58; 56-59-66; 35-39-68
Cervista HPV test*	DNA	signálna	L1/E6/E7	14 hrHPV (samostatne 16, 18)
cobas 4800 HPV test*	DNA	cieľová	L1	16, 18 a 12 hrHPV (ako HC2 plus 66)
qPCR (E6/E7)*	DNA	cieľová	E6/E7	hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68) a lrHPV6, 11
HPV-Risk assay*	DNA	cieľová	E7	16, 18 a 13 hrHPV (ako HC2 plus 66 a 67)
PapilloCheck HPV screening test*	DNA	cieľová	E1	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 a lrHPV: 6, 11, 40, 42, 43, 44
GP5+/6+ PCR-LMNX	DNA	cieľová	L1	hrHPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, detekuje tiež 26, 53, 73 a 82
careHPV Test	DNA	signálna	celý genóm	-
Prepect HPV-Proofer	RNA	cieľová	E6/E7	16, 18, 31, 33, 45

(prevzaté a upravené z Arbyn *et al.*, 2015)

⁺ štandardizované HPV testy

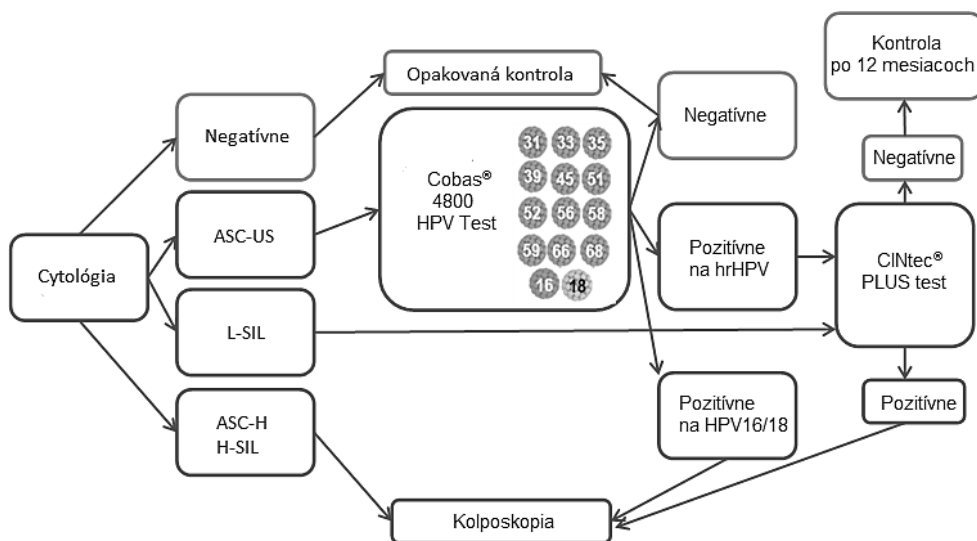
* validované HPV testy podľa Meijerovho protokolu

4.3.3 Triážové testy

Ako alternatívne riešenie zníženia FP vzoriek je použitie potenciálnych markerov asociovaných s vysokým rizikom progresie do CIN2+/3+. Testy založené na p16^{INK4a}/Ki-67 duálnom farbení a detekcií hypermetylácie promotóru u génov *CADM1*, *MAL* a *miR124-2* ako doplnková metóda k HPV testom, ktoré by ponúkli presnejšiu interpretáciu hrHPV+ pozitívnych vzoriek (Del Mistro *et al.*, 2017).

Inhibítor cyklin-dependentnej kinázy p16^{INK4a} (taktiež len p16) je regulačný proteín bunecného cyklu (BC), ktorý je deregulovaný nadmernou expresiou hrHPV onkoproteínu E7 v proliferujúcich bunkách. V normálnych bunkách sa expresia p16 a Ki-67 navzájom vylučuje. Deregulácia BC umožní proteínu Ki-67 súčasnú detekciu expresie proteínu p16 v cervikálnych bunkách. Samotná detekcia inhibítora prostredníctvom duálneho farbenia cytológie vykazovala vyššiu SE o 18 % v porovnaní s klasickou cytológiou (Pap test). Zároveň ponúka vyššiu SP v porovnaní s HPV testovaním, vďaka čomu sa znížil počet FP vzoriek o 50 %. V kombinácii duálneho farbenia s testom hrHPV bola detekovaná vyššia SE pre \geq CIN2+ 95,2 % u žien mladších ako 30 rokov (Dijkstra *et al.*, 2014; Ikenberg *et al.*, 2013).

Proces využila firma Roche pre vývoj imunocytochemického testu **CINtec[®] PLUS test**. Princíp testu spočíva na farbení p16/Ki-67 v prípade abnormálnych cytologických výsledkov ASC-US a L-SIL alebo hrHPV pozitívnych vzorkách (Tjalma, 2017). Algoritmus použitia CINtec[®] PLUS test-u je znázornený na Obr. 7.



Obr. 7: Screeningový algoritmus s použitím CINtec[®] PLUS test. V prípade pozitívneho výsledku na hrHPV prostredníctvom cobas[®] 4800 HPV Test-u a u vzoriek s L-SIL prostredníctvom cytológie je doporučené použitie CINtec[®] PLUS testu (prevzaté a upravené z <http://patologija.lt/wp-content/uploads/2016/11/algoritmas.png>, stiahnuté 23.10.2017).

V rozsiahlej štúdií Kaiser Permanente Northern California (KPNC) bolo prevedené porovnanie doplnkového farbenia s cytológiou na hrHPV pozitívnych vzorkách. Dvojité farbenie p16^{INK4a} a Ki-67 malo vyššiu SE i SP s nižšou mierou odporúčania

pacientiek na kolposkopii v porovnaní s cytológiou. HPV pozitívne ženy, ktoré boli pozitívne na dvojité farbenie mali vysoké riziko CCa s okamžitým podstupením kolposkopie, zatiaľ čo negatívne farbenie odporúča opätovné testovanie po 12 mesiacoch (Wentzensen *et al.*, 2016). Je však potrebné ďalšie overovanie, či by metóda bola vhodná ako triážový test pre screening HPV. U žien od 18 rokov by mohol tento test slúžiť k presnejšej identifikácii prekursorových lézií v kombinácii s HPV testom. Umožnil by rozlíšiť zdravé ženy s prechodnou HPV infekciou od žien s vysokým rizikom vzniku CIN3+, ASC-US alebo L-SIL lézií (Roche, 2017; Ikenberg *et al.*, 2013).

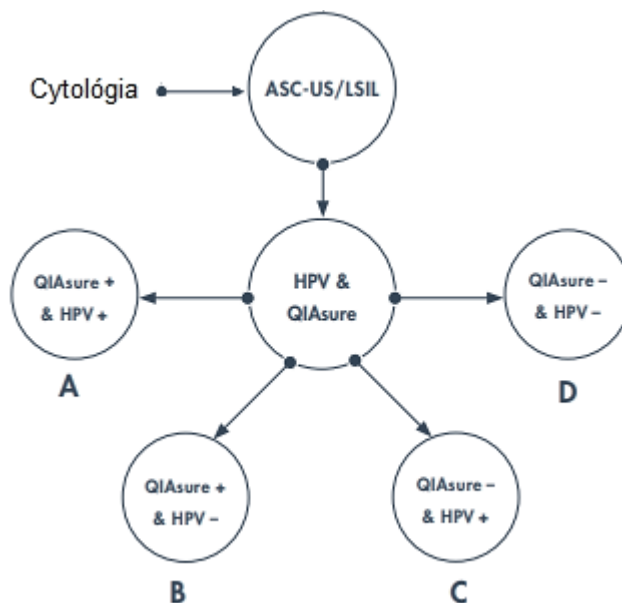
Zmeny expresie onkoproteínov a strata funkcie nádorových supresorových génov sú potrebné pre vznik plne invazívnej rakovinej bunky. Jednou z možností, ako môžu byť supresory inaktivované je hypermetylácia ich promotórovej oblasti. Zmienená detekcia metylácie môže byť využitá ako potenciálny biomarker najmä ak bola detekovaná už v prekarcerózných štádiách. Úroveň metylácie promotórov génov *CADM1* (bunková adhézna molekula 1), *MAL* (proteín asociovaný s maturáciou T-lymfocytov) a *miR124-2* (*microRNA-124-2*) sa zvyšuje so stupňom CIN, najvyššia úroveň metylácie promotórov týchto génov je u CCa (100 %) (Dijkstra *et al.*, 2014; Del Mistro *et al.*, 2017).

PreCursor M-kit (Diassay) detekuje zvýšené hladiny metylácie u génov *CADM1* a *MAL*. Tento metylačný test je schopný rozlíšiť ženy s dlhodobými CIN2+ so zvýšeným rizikom progresie do CCa. Slúžil by ako potenciálny triážový test na potvrdenie prítomnosti/neprítomnosti pretrvávajúcej CIN u hrHPV pozitívnych pacientkách. Zároveň výsledky dokazujú, že metylačne negatívny výsledok pre CIN2+ u mladých žien predstavuje léziu schopnú regresie s vysokou pravdepodobnosťou (van Baars *et al.*, 2016).

The QIAure Methylation Test (Qiagen) je multiplex real-time metylačne-špecifická PCR (qMSP), ktorý sa využíva ako doplnkový test u žien s pozitívnym HPV testom alebo s cytologickým nálezom ASC-US alebo L-SIL. Je založený na detekcii hypermetylácie promotórov amplifikáciou biomarkerov *FAM19A4* (gén kódujúci malé sekretované proteíny) a *miR124-2* (*microRNA-124-2*) spojených s transformáciou cervikálnych buniek nielen u CIN2/3 ale i u normálnej cytologie. Môže odlíšiť ženy s pokročilou transformáciou CIN (vysoké riziko progresie) od tranzientných CIN – bez hypermetylácie (nízke riziko progresie). Ponúka vysokú citlivosť – až 100 % v prípade detekcie CCa v hrHPV+, CIN3+ 88,9 %, u CIN3 63,3 %, u CIN2 52,4 % a 28,2 % < CIN1. Pacientky s vysokým rizikom

progresívnej transformácie CIN sú odporučené na kolposkopiu. V prípade detekcie nízkych hladín metylácie promotórov u *FAM19A4* a *miR124-2* je pravdepodobné nízke riziko progresie do CCa a pacientky majú byť naďalej sledované podľa algoritmu na Obr. 8 (Qiagen, príbalový leták ku QIASure Methylation Test Kit-u).

Metylačnou analýzou *FAM19A4/miR124-2* v kombinácii s genotypizáciou HPV16/18 došlo k zníženiu špecificity pre CIN3+ 46 %. Dôsledok viedol k zisku signifikantne vyššej SE pre CIN3+ 88,5 %. Výhodou analýzy je detekcia všetkých abnormalít spojených s CCa (De Strooper *et al.*, 2016)



Obr. 8: Screeningový algoritmus s použitím QIASure Methylation Test Kit-u. A, B – pozitívny výsledok testu značí vysoké riziko transformácie CIN, je doporučená kolposkopia; C, D – negatívny výsledok testu značí nízke riziko pokročilej transformácie CIN, nie je doporučená kolposkopia (prevzaté a upravené z Qiagen, príbalový leták ku QIASure Methylation Test Kit-u).

Súčasný triedenie hrHPV+ pozitívnych pacientek nie je úplne ideálne. Detekcia HPV testami vedie k zvýšenému počtu falošne pozitívnych výsledkov, kvôli nižšej SP oproti cytológiám a nemôže byť tak uplatnená pre ženy mladšie ako 30 rokov. Cytológia naopak postráda vyššiu SE (pre ASC-US len okolo 53,7 %), ktorá vedie k prípadnému vynechaniu detekcie neoplastických zmien. Identifikácia hypermetylácie promotórov génov *CADM1*, *MAL*, *FAM19A4* a *miR124-2* poskytuje nádej pre mladšie ženy, ktoré by boli doplnkovo triedené prostredníctvom zmienových triážových testov. Súčasne by ponúkli presnejšiu interpretáciu vzoriek s ASC-US a L-SIL alebo pozitívnym HPV testom aj u žien starších 30 rokov (Mureşan *et al.*, 2016; Qiagen, príbalový leták k QIASure Methylation Test Kit; van Baars *et al.*, 2016; Valentine *et al.*, 2016; Agorastos *et al.*, 2015).

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Už v bakalárskej práci bol rozobratý problém v rozpoznaní prechodnej od perzistentnej HPV infekcie (progresia k vzniku CCa). Presná identifikácia CIN je potrebná pre správne nastavenú liečbu v prípade nutnosti vykonania kolposkopie. V súčasnosti je v praxi aplikované využitie cytológie v kombinácií s HPV testami u ASC-US s genotypovou analýzou HPV16/18. Budúcnosť screening-ových programov HPV diagnostiky je zameraná na využitie metód práve na báze PCR (De Strooper *et al.*, 2016).

V práci boli vybrané patientské vzorky cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov pozitívne na HPV33 alebo HPV51 analyzované testami cobas[®] 4800 HPV Test a PapilloCheck[®] HPV-Screening. Genotypová analýza bola prevedená pomocou PapilloCheck[®] HPV-Screening-u. Cobas[®] 4800 HPV Test (Roche, USA) pozostáva z prístroja cobas x 480 pre plne automatickú prípravu vzorky a analyzátoru cobas z 480. Tento systém založený na real-time PCR je schopný samostatnej genotypizácie HPV16/18 a súčasnej detekcie ostatných hrHPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68 (Roche, 2012). Test PapilloCheck HPV-Screening (Greiner Bio-One GmbH, Nemecko) pracuje na princípe PCR mikročipov zameraných na *E1* HPV gén. Oligonukleotidy imobilizované na mikroarrayi umožňujú identifikáciu až 24 HPV genotypov: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42-45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 a 82. Test využíva amplifikáciu 350 bp HPV DNA fragmentu ako nového konsenzuálneho setu primerov: každý Rw primer je predĺžený na 5' konci. Oblasť génu *ADAT1* je súčasne amplifikovaná za použitia fluorescenčne značeného primeru Cy5-dUTP. Amplikony hybridizujú so špecifickými sondami na mikroarrayi. Vyhodnotenie prebieha na CheckScanner-y (Dalstein *et al.*, 2009). Screeningové HPV testy dosahujú klinickú SE pre cobas[®] 4800 HPV Test 90 % pre CIN2, 93,5 % pre CIN3 a SP 70,5 % pre CIN2 (Roche, 2012). Pre Pre PapilloCheck[®] HPV-Screening bola klinická SE 95,8 % pre CIN3 a SP 96,7 % pre CIN2 (Greiner Bio-One, 2011).

Prvá časť celého postupu spočívala v navrhnutí primerov a prób prostredníctvom softwaru PrimerQuest Tool pre *E2* a *E6* gény. Tieto gény sú významné pri určení formy HPV. Epizomálna forma HPV obsahuje rovnaký počet kópií týchto génov. Po integrácii do hostiteľskej bunky zvyčajne dochádza k narušeniu funkcie epizomálneho *E2* génu, dôsledkom je zníženie počtu kópií génu *E2*. Zatiaľ čo u génu *E6* k porušeniu nedochádza. Prostredníctvom pomeru *E2/E6* HPV DNA génov sme následne schopní určiť formu HPV DNA (Peitsaro *et*

al., 2002). Napriek integrácií nedochádza vždy k zjavnému zníženiu počtu kópií *E2* génu, ktorá by bola detekovaná ako integrovaná forma HPV. Ako príčina sa uvádza, že gén *E2* býva exprimovaný v horných vrstvách CIN1 a CIN2 s pravdepodobným znížením expresie a poklesu počtu kópií génu *E2* u CIN3 (Xue *et al.*, 2012).

Správna funkčnosť navrhnutých primerov bola overená na 3 pozitívnych vzorkách prostredníctvom kvantitatívnej multiplex real-time PCR. Technológia umožňuje amplifikáciu a súčasnú kvantifikáciu cieľovej DNA pri každom cykle PCR. Fluorescenčné farbivá interkalujú s dvojvláknovou DNA alebo so sondami špecifickými pre danú sekvenciu. Samotný proces prebieha v termocyclery, kde je meraná fluorescencia po každom cykle. Metóda bola vyvinutá pre kvantifikáciu HPV DNA v klinických vzorkách (Molijn *et al.*, 2005) schopná detekovať *viral load* s rozsahom až \log^{-7} . Multiplex real-time PCR umožňuje takúto extrapoláciu zvlášť pri malých koncentráciách vzoriek, ktoré klasická PCR nie je schopná detekovať. Zároveň ponúka rýchle, relevantné a reprodukovateľné výsledky v klinickom prostredí (Zaravinos *et al.*, 2009).

Ďalším krokom bolo vytvorenie kalibračných rad (KR) na stanovenie limitu detekcie (LOD), celkovej linearity a koeficientu variácie (CV) intra-assaye v rozsahu $2 \times 10^5 - 2 \times 10^0$ kópií/reakciu prostredníctvom kvantitatívnej multiplex real-time PCR. Vybrala sa jedna KR s najviac lineárnym priebehom pre obidva HPV genotypy. KR s/bez DNA s bunečnou líniou CEM umožnili porovnať a overiť, že novo navrhnuté detekčné systémy fungujú rovnako aj u simulovanej vzorky. U navrhnutých detekčných systémov sme skontrolovali možnosť krížovej reaktivity (*cross reactivity*) s inými než cieľovými HPV genotypmi.

Následne sme detekčné systémy použili k vyšetreniu všetkých patientských vzoriek pozitívnych na HPV33 alebo HPV51. Zo získaných dát bola vypočítaná analytická senzitivita a špecificita novo navrhnutých detekčných metód. Medzi vypočítanými údajmi bolo určenie formy HPV infekcie podľa pomeru počtu kópií jednotlivých génov *E2* a *E6* HPV infekcie: epizomálna (E; $>0,8$), integrovaná (I; $<0,4$) a zmiešaná (Z; $0,4-0,8$) (Martinková, 2016).

5.1 Materiál, pomôcky a prístrojové vybavenie

5.1.1 Použité chemikálie

Ambion[®] DEPC-treated voda (Thermo Fisher Scientific, USA); Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), súčasť kitu: Qubit[®] dsDNA HS buffer, Qubit[®] dsDNA HS Standard #1, Qubit[®] dsDNA HS Standard #2, Qubit[®] dsDNA HS Reagent 200× (fluorescenčná fabička, Thermo Fisher Scientific, USA); Qubit[®] dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), súčasť kitu: Qubit[®] dsDNA BR buffer, Qubit[®] dsDNA BR Standard #1, Qubit[®] dsDNA BR Standard #2, Qubit[®] dsDNA BR Reagent 200× (fluorescenčná fabička, Thermo Fisher Scientific, USA); Thermo-Start PCR pufer 10× (Thermo Fisher Scientific, USA); MgCl₂ (25 mM, Thermo Fisher Scientific, USA); Thermo-Start *Taq* DNA polymerasa (250 U, 50 U/μl, Thermo Fisher Scientific, USA); Eva green[®] qPCR Mix Plus (Biotium, USA); dNTP (100 mM, Promega, USA)

Primery a próby pre genotypy HPV33 a HPV51 použité v tejto práci boli vyrobené firmou Geneti Biotech (Česká republika). Z dôvodu plánovaného patentovania tohto testu nie je možné sekvencie primerov a prôb zverejniť. Próby pre *E2* gén boli značené FAM-BHQ1 (5 nmol), próby pre *E6* HEX-BHQ2 (5 nmol) a próba pre *GAPDH* Cy5- BHQ2 (Martinková, 2016).

5.1.2 Použitý biologický materiál

- genómová DNA HPV33 klonovaná vo vektore pBRdriv (klonovacie miesto Bg1II; Karolinska Institutet, Švédsko)
- genómová DNA HPV51 klonovaná vo vektore pUC13 (klonovacie miesto HindIII; Karolinska Institutet, Švédsko)
- DNA izolovaná z T-lymfoblastickej leukemickej bunecnej línie CEM (Thermo Fischer Scientific, USA)

5.1.3 Použité pomôcky a prístrojové vybavenie

špičky s filtrom (eppendorf[®], Nemecko); pipety (eppendorf[®], Nemecko); eppendorfky (1,5 ml); stojany; chladené stojany; mikroskúmavky; stojan na PCR mikroskúmavky; PCR skúmavky (50 ml); Qubit[®] Fluorometer 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA); Qubit[®] assay tubes (Thermo Fisher Scientific, Čína); vortex MIXER VX-200 (Labnet, USA); flowbox (Mars Safety Classe 2, ScanLaf, Škandinávia); 8-skúmavkové stripy (BIOplastics, Holandsko); 96 jamková

mikrotitračná PCR doštička AD-plate 0,3 ml (Roche, Švajčiarsko); priesvitná tesniaca fólia (MicroAmp® Optical Adhesive Film, Thermo Fischer Scientific, USA); PCR termocykler LightCycler® 480 Instrument II (Roche, Švajčiarsko); centrifuga Mini Spin (eppendorf®, Nemecko); votex mixer PV-1 (Grant-bio, Veľká Británia), minicentrifuga FVL-2400N Combi-Spin (Biosan, Lotyšsko), centrifuga 5430 (eppendorf®, Nemecko); minicentrifuga GmCLab (Gilson, USA)

5.2 Zloženie roztokov

PCR mixy:

HPV33 E2 E6	300 µl voda, 4 µl E2 PFW, 4 µl E2 PRw, 2 µl E2 próba, 4 µl E6 PFW, 4 µl E6 PRw 2 µl próba
HPV51 E2 E6	300 µl voda, 4 µl E2 PFW, 4 µl E2 PRw, 2 µl E2 próba, 4 µl E6 PFW, 4 µl E6 PRw 2 µl próba
GAPDH	308 µl voda, 4 µl PFW, 4 µl PRw, 2 µl próba

5.3 Vzorky patientských cervikálnych sterov

Diplomová práca bola prevedená podľa návrhu štúdie schválenou Etickou Komisiou Lekárskej fakulty a Zubného lekárstva Univerzity Palackého a Fakultnej nemocnice v Olomouci, v súlade s Helsinskou deklaráciou. Všetci účastníci štúdie podpísali informovaný súhlas s využitím ich biologického materiálu pre výskumné účely. Z celkového počtu 2 416 vzoriek cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov bolo na HPV infekciu pozitívnych 672 vzoriek, na hrHPV bolo pozitívnych 614 vzoriek. V rámci experimentálnej časti boli analyzované vzorky zaslané z kolposkopických poradní (n = 50), z IVF klinik (n = 39), vzorky získané pomocou samoodberovej sady Evalyn brush (Rovers medical, n = 7) a 1 vzorka vyšetovaná v rámci externého porovnávania kvality. Testované pacientky boli vo veku od 20 do 56 rokov. Spolu bolo testovaných 40 HPV33 (39 cervikálnych a 1 cerviko-vaginálny ster) a 57 HPV51 (51 cervikálnych a 6 cerviko-vaginálnych sterov) pozitívnych vzoriek testovaných prostredníctvom PapilloCheck® HPV-Screening (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemecko).

5.4 Použité metódy a pracovné postupy

Pri manipulácií so vzorkami a reagensiami boli, rovnako ako pri ich skladovaní, dodržiavané pravidlá práce v pre-PCR, PCR a post-PCR laboratóriu. Príprava reakčných zmesí a práca s patientskými vzorkami prebiehala v sterilných laminárnych boxoch, určených výhradne pre danú časť postupu. Všetky reagentie použité na prípravu reakčných zmesí, boli pred použitím a po použití uskladnené pri - 20 °C. Rozmrazovanie potrebných činidiel prebiehalo oddelene od materiálu obsahujúceho DNA. V priebehu prípravy reakčných zmesí bola použitá termostabilná *Taq* polymeráza, po celú dobu chladená v chladiacom stojane. Všetky vzorky, reagentie a reakčné zmesi boli pred použitím pulzne zvortexované a stočené na stolnej centrifuge s vortexom.

5.4.1 Navrhnutie primerov pre genotypy HPV33 a HPV51

Prvým krokom bolo vyhľadanie DNA sekvencie genómu daného typu pre gén *E2* v oblasti 3 200-3 700 bp, pre gén *E6* v oblasti 100-500 bp (<https://pave.niaid.nih.gov/>). Následné navrhnutie primerov pre obidva genotypy prebiehalo prostredníctvom softwaru od firmy Geneti Biotech - PrimerQuest Tool (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>). Podmienky, ktoré mali byť splnené: PCR produkt o veľkosti 80-150 bp; teplota topenia (*melting temperature*) okolo 60 °C (max 68 °C); obdobne dlhé PCR produkty. U primerov navrhnutých softwarom sme preverili, či sa netvoria vlásenkovité štruktúry (*hairpins*), poprípade teplota ich topenia. Ďalej sme pomocou softwaru BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) overili špecificitu primerov len pre detekované genotypy. Overená bola predovšetkým možnosť interakcie primerov s inými genotypmi, ľudskou DNA a DNA fyziologickou i patogénnou genitálnou flórou. Následne bola overená funkčnosť špecifických primerov na 3 pozitívnych vzorkách pre obidva genotypy a na plazmidoch so zaklonovanými genómami HPV33/HPV51. Po overení funkčnosti primerov sme doobjednali próby.

5.4.2 Overenie funkčnosti primerov

Príprava 2 primerov pre HPV33 a HPV51 spočívala v zmiešaní 152 µl DEPC H₂O, 4 µl Fw a 4 µl Rw (bez pridania próby) pre *E2* a *E6* gén. Reagentie boli pripravené podľa tabuľky 4. Ako negatívna kontrola (NC) bolo použitých 2 µl vody a ako pozitívnu kontrolu (PC) sme použili plazmid obsahujúci genóm HPV33/51. Reakčná zmes vytvorená podľa tabuľky 4 bola rozpipetovaná do stripu, po stočení

v minicentrifuge bol spustený PCR program podľa tabuľky 6. U všetkých 3 pozitívnych vzorkách bola overená funkčnosť detekčných systémov pre obidva genotypy, ktoré boli testované v duplikáte.

Tab. 4: Schéma použitá na prípravu PCR mixu na 1 reakciu.

PCR mix	Finálna koncentrácia	1 R (μl)
Thermo-Start PCR pufer (10×)	1×	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	3
Primer <i>E2</i> , <i>E6</i>	0,2 mM	2
Eva green	100 nM	1
Thermo-Start <i>Taq</i> polymerasa (5 U/μL)	1 U	0,2
dNTP (10 mM)	0,2 mM	0,5
DEPC H ₂ O		13,8
DNA		2
Celkový objem		25

5.4.3 Stanovenie limitu detekcie a linearity assaye

U plazmidov pre HPV33 a HPV51 použitých ako kontrola bola zmeraná koncentrácia pomocou fluoromera Qubit[®] dsDNA HS Assay kit. Kalibrácia a meranie boli prevedené podľa návodu pre prístroj Qubit 2.0[®]. Po kalibrácii prístroja bola zmeraná koncentrácia plazmidu v 1 μl vzorky pomocou kitu Qubit[®] dsDNA HS kitu. Koncentrácia plazmidu s genómom HPV33 bola 0,230 ng/μl a pre plazmid s genómom HPV51 bola 0,416 ng/μl.

Plazmidy boli nariedené a použité k vytvoreniu KR v rozpätí 2×10^5 - 2×10^0 kópie plazmidu (1 kópia *E2* génu a 1 kópia *E6* génu)/reakciu. Primery a próba pre gény *E2* a *E6* boli pripravené zmiešaním 300 μl vody, 4 μl *E2* PFW, 4 μl *E2* PRw, 2 μl *E2* próba, 4 μl *E6* PFW, 4 μl *E6* PRw 2 μl próby pre obidva typy genotypov.

Plazmidy boli najprv pripravené na rozsah 2×10^7 kópie plazmidu/μl. Pre HPV33 bolo zmiešaných 5 μl DNA (0,230 ng/μl) a 4,2 μl vody; $[(1,84 \times 10^8 / 2 \times 10^7) = \text{finálny objem } 9,2 \mu\text{l} = 5 \mu\text{l DNA} + 4,2 \mu\text{l vody}]$. Pre HPV51 bolo zmiešaných 5 μl DNA (0,416 ng/μl) a 429,23 μl vody; $[(8,6846 \times 10^9 / 2 \times 10^7) = \text{finálny objem } 434,23 \mu\text{l} = 5 \mu\text{l DNA} + 429,23 \mu\text{l vody}]$. Nariedenie plazmidov v rozpätí 2×10^7 na rozpätie 2×10^5 kópií plazmidu predstavovalo pre HPV33 i pre HV51 zmiešanie 5 μl DNA a 495 μl vody. Takto pripravený plazmid bol

napietovaný po 100 µl do prvej jamky stripu. Do jamiek 2-6 bolo pridaných 90 µl vody, 7 jamka slúžila ako negatívna kontrola (NC). KR boli pripravené riedením faktorom 10, popísané a použité v nasledujúcom kroku pri otestovaní LOD a linearity jednotlivých setov primerov a prób pre detekciu HPV33 a HPV51 v multiplex real-time PCR.

5.4.4 Real-time PCR

Reakčná zmes pre obidva genotypy bola vytvorená podľa tabuľky 5. Amplifikácia bola prevedená v 96 jamkovej PCR doštičke do finálneho objemu 25 µl. Reagensie boli rozpipetované 8-kanálovou pipetou po 23 µl PCR mixu a 2 µl príslušnej DNA z pripravenej KR. Každá KR bola analyzovaná v duplikáte. Posledná 7 jamka slúžila ako NC (PCR mix bez pridanej DNA a 2 µl vody).

Mikrotitračná PCR doštička bola zalepená priesvitnou tesniacou fóliou a po stočení v centrifuge prenesená do PCR termocycleru. Príslušné parametre pre real-time PCR program sú uvedené v tabuľke 6. Po úspešnom otestovaní bol stanovený LOD a linearita detekcie KR pre HPV33 a HPV51 s výberom najvhodnejšej KR, ktorá sa použila v ďalších postupoch.

Tab. 5: Schéma použitá na prípravu PCR mixu na 1 reakciu.

PCR mix	Finálna koncentrácia	1 R (µl)
Thermo-Start PCR pufer (10×)	1×	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	3
Primer mix vrátane próby	0,2 mM	4
Thermo-Start Taq polymerasa (5 U/µL)	1 U	0,2
dNTP (10 mM)	0,2 mM	0,5
DEPC H ₂ O		12,8
DNA z KR		2
Celkový objem		25

Tab. 6: Program pre PCR reakciu.

PCR program			
Predenaturácia	95 °C	15 min	
Denaturácia	95 °C	15 s	45 cyklov
Annealing a elongácia	60 °C	60 s	
Chladenie	4 °C	∞	

5.4.5 Simulácia reálnej vzorky DNA

Ďalším cieľom práce bolo tzv. simulovanie reálnej vzorky (DNA z cervikálneho steru) s možným porovnaním CV priemeru u koncentrácie a C_p pre jednotlivé rozpätia KR so smerodatnou odchýlkou (SD) bez/s CEM DNA. Porovnaním týchto parametrov bola overená podobná funkčnosť detekčného systému u KR len s použitím plazmidu, ako aj u KR s CEM DNA (príloha 1-4).

Celý postup spočíval v otestovaní KR s pridaním 50 ng DNA z bunečnej línie CEM (25 ng/ μ l), tzn. 2 μ l DNA/reakciu. V prvom kroku bola zmeraná koncentrácia DNA CEM na Qubit[®]-e dsDNA BD (Broad-Range) Assay kit podľa návodu s reagentmi pre BD Assay kit. Do PCR mixu boli napipetované reagencie podľa tab. 7 s pridaním 2 μ l/reakciu *GAPDH* a 2 μ l/reakciu DNA (25 ng/ μ l), s výsledným objemom PCR mixu 23 μ l na reakciu. PCR mix bol následne rozpipetovaný 8-kanálovou pipetou po 23 μ l do PCR doštičky do jamiek 1-6.

Ďalším krokom bolo pridanie 2 μ l DNA z KR do výsledného objemu 25 μ l na reakciu. Do reakcie boli zahrnuté taktiež dva druhy NC. Prvá NC bola úplne bez DNA (objem DNA nahradený DEPC vodou), druhá kontrola obsahovala len 50 ng CEM DNA. Stočená mikrotitračná PCR doštička bola presunutá do termocycleru, kde bol spustený PCR program podľa tab. 6.

Tab. 7: Schéma použitá na prípravu PCR mixu na 1 reakciu.

PCR mix	Finálna koncentrácia	1 R (μ l)
Thermo-Start PCR pufer (10 \times)	1 \times	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	3
Primery a próba pre <i>E2</i> a <i>E6</i> gény	0,2 mM	4
Thermo-Start <i>Taq</i> polymerasa (5 U/ μ L)	1 U	0,2
dNTP (10 mM)	0,2 mM	0,5
<i>GAPDH</i>		2
DEPC H ₂ O		8,8
DNA z CEM (25 ng/ μ l)		2
DNA z KR		2
Celkový objem		25

5.4.6 Test krížovej reaktivity (*cross reactivity*)

Analyzované vzorky pozitívne na HPV33/51 môžu byť pozitívne aj na iné typy HPV genotypov, napríklad: HPV16, 18 apod. Preto bolo nevyhnutné otestovať krížovú reaktivitu u navrhnutých primerov a prób s vylúčením falošnej positivity u vzoriek pozitívnych na iné než cieľové HPV genotypy (Preisler *et al.*, 2016). Za týmto účelom boli testované vzorky uvedené v tabuľke 8.

Na test krížovej reaktivity bolo vybratých 15 vzoriek DNA z cervikálnych sterov pre HPV33 (okrem genotypu HPV33), 14 vzoriek pre HPV51 (okrem genotypu HPV51) a 5 HPV negatívnych vzoriek. Krížová reaktivita bola testovaná na iných než cieľových HPV genotypoch: 13hrHPV (16, 18, 31, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82), 7 lrHPV (6, 11, 40, 42, 43 a 44/55) a 2 pravdepodobne onkogénne HPV genotypy HPV53 a 66 (Ondryášová *et al.*, 2013).

Tab. 8: Vzorky vybraté na testovanie cross-reactivity pre HPV33 a HPV51.

č. vzorky	číslo	genotyp HPV33	číslo	genotyp HPV51
1	7	HPV42, 82, 70	7	HPV42, 82, 70
2	447	HPV40, 59	871	HPV39, 73
3	871	HPV39, 73	872	HPV16, 18, 42, 56
4	872	HPV16, 18, 42, 56	1350	HPV31, 82
5	1030	HPV16, 31, 51, 70	2211	HPV52, 68
6	1350	HPV31, 82	3135	HPV58, 73, 82
7	2129	HPV11, 31, 51	3143	HPV42, 44,45, 73
8	2211	HPV52, 68	3172	HPV35, 40
9	2282	HPV42, 51, 53, 70	3312	HPV6, 35
10	3107	HPV16, 18, 39, 51, 59	3628	HPV31, 43, 45
11	3135	HPV58, 73, 82	3705	HV18, 56, 59, 70
12	3143	HPV42, 44, 55, 73	3737	HPV39, 66, 68, 70
13	3312	HPV6, 35	3927	HPV31, 33
14	3430	HPV59, 66	3936	N
15	3628	HPV31, 43, 45	3938	N
16	3936	N	3943	N
17	3938	N	3944	N
18	3943	N	3945	N
19	3944	N	3959	HPV16, 53, 11
20	3945	N	-	-

* N = HPV negatívne

Prvý krok spočíval v príprave PCR mixu podľa tab. 7 (DNA z cervikálneho steru) pre obidva genotypy. Následne bolo rozpipetovaných po 23 μ l do mikrotitračnej PCR doštičky. KR pre HPV33, HPV51 i *GAPDH* boli testované v duplikáte, rovnako ako NC (DEPC voda). Všetky vzorky boli otestované v triplikáte. Test na krížovú reaktivitu bol pre HPV33 i pre HPV51 negatívny pre všetky vzorky (pozitívne len KR). Nedochoádzalo ku krížovej reaktivite, vďaka čomu mohli byť priamo otestované patientské vzorky cervikálnych sterov.

5.4.7 Analýza patientských vzoriek

Po overení limitu detekcie, celkovej linearity assaye a vylúčení prípadnej *cross reactivity* s ostatnými HPV genotypmi boli pomocou novo navrhnutých detekčných systémov vyšetrené patientské vzorky. 40 vzoriek cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov pre HPV33 a 57 vzoriek pre HPV51 (z nich u 12 vzoriek bol prevedený celý postup izolácie DNA prostredníctvom kitu QIAamp[®] DNA Micro Kit-u; postup viz. Martinková, 2016). Príprava PCR mixu prebiehala podľa postupu v kroku 5.4.5 podľa tab. 7 (namiesto DNA z CEM použitá DNA z cervikálneho/cerviko-vaginálneho steru). Všetky reagensie boli rozpipetované do mikrotitračnej PCR doštičky s následným pridaním 2 μ l DNA z patientských sterov. Kalibračná rada a *GAPDH* boli testované v duplikáte, všetky patientské vzorky v triplikáte. Zo získaných výsledkov bola vypočítaná SE a SP navrhnutých systémov. Podľa pomeru počtu kópií jednotlivých génov *E2* a *E6* bolo možné určiť formu HPV infekcie: epizomálna E (>0,8), integrovaná I (<0,4) a zmiešaná Z (0,4-0,8) (Martinková, 2016).

6 VÝSLEDKY

Samotné vyšetrenie všetkých vzoriek pozitívnych na HPV33 a HPV51 predchádzalo overenie funkčnosti navrhnutých detekčných systémov pre diagnostiku HPV na malom počte pozitívnych patientských vzoriek prostredníctvom multiplex real-time PCR. Po overení funkčnosti sme prostredníctvom kalibračných rad stanovili limit detekcie 4 kópie/reakciu u HPV33 a HPV51 pre KR bez CEM DNA a u HPV33 s CEM DNA (príloha 1-4). Prostredníctvom KR bolo overená možnosť kvantifikovať počet kópií *E2* a *E6* HPV génov v rozpätí 400 000 až 4 kópie u HPV33 a u HPV51 len v prípade bez CEM DNA (príloha 1-4). V prípade simulovanej vzorky s CEM DNA u HPV51 nebol detekovaný gén *E2* a *E6* pre 4 kópie/reakciu, na základe čoho nebol zistený najnižší limit detekcie u tohto HPV genotypu (príloha 3, príloha 4).

Zároveň bola prostredníctvom KR stanovená linearita assaye prostredníctvom koeficientu determinácie (R^2) pre obidva genotypy HPV33 a HPV51 bez/s DNA s bunečnou líniou CEM uvedená v tab. 9. Linearita KR pre HPV33 bola $0,9903 \pm 0,007$. Podobné hodnoty lineárnej regresie pre HPV33 vykazovala štúdia od *Depuydt et al.*, ktorá zároveň určila u CIN3+ hodnotu pre $R^2 \geq 0,85$. Linearita pre HPV51 bola $0,9938 \pm 0,004$ ale do tohto merania nebola zarátaná detekcia rozpätia 4 kópie/reakciu pre simulovanú vzorku CEM DNA (príloha 3, príloha 4). V tomto prípade nie je možné hodnotiť celkovú linearitu pre tento HPV genotyp.

Tab. 9: Linearita assaye pre KR s HPV33 a HPV51 genotypom.

Použitý plazmid	HPV gén	R^2 HPV genotypu	
		HPV33	HPV51
Plazmid s genómom bez CEM DNA	<i>E2</i>	0,9961	0,9962
	<i>E6</i>	0,9968	0,9972
Plazmid s genómom + 50 ng CEM DNA	<i>E2</i>	0,9837	0,988 ⁺
	<i>E6</i>	0,9847	0,9938 ⁺
priemer $R^2 \pm SD$		$0,9903 \pm 0,007$	$0,9938^+ \pm 0,004$

* R^2 – koeficient determinácie, CEM – bunečná línia, SD – smerodatná odchýlka

⁺ pri tomto koeficiente determinácie nebolo zarátané posledné riedenie 2×10^0 (4 kópie/reakciu)

Komparácia koncentrácie a C_p medzi DNA s plazmidom a simulatnou vzorkou DNA, ktorá okrem plazmidu obsahovala 50 ng DNA z bunečnej línie CEM (25 ng/ μ l) bola zistená podobná funkčnosť detekčných systémov. Podľa

koeficientu variácie CV (%) bola zistená hodnota pre intra-assay pre každé rozpätie KR ako podiel SD z priemeru 2 hodnôt plazmidu s génomom HPV33/51 bez a s CEM DNA, ktorá sa delila priemerom hodnoty a vynásobila $\times 100$. Priemer jednotlivých hodnôt CV sa uvádza ako CV vrámci testu a mal by dosahovať hodnoty menej ako 10 % (<https://www.salimetrics.com/inter-and-intra-assay-coefficients-of-variability/>). Analýza toto tvrdenie nepotvrdila, kde výsledky pre CV u HPV33 dosahovali pre E2 gén hodnoty 16,6 % a pre gén E6 14,6 %. Nižšie hodnoty CV boli získané z genotypu HPV51 pre gén E2 10,9 % a pre gén E6 6,5 %. Porovnaním hodnôt Cp boli zistené hodnoty intra-assay CV pre E2 a E6 gény HPV33: 3,4 a 3,2 % a pre genotyp HPV51 pre E2 gén 2,02 % a pre E6 gén 1,3 % (príloha 1-4).

Zároveň bola vylúčená cross reaktivita s HPV genotypmi, na ktoré test nebol cielený, tj. ďalších 13 hrHPV, 7 lrHPV a 2 pravdepodobne onkogénnymi HPV genotypmi. Na test bolo vybratých 15 vzoriek DNA z cervikálnych sterov pre HPV33 (okrem genotypu HPV33), 14 vzoriek pre HPV51 (okrem genotypu HPV51) a 5 HPV negatívnych vzoriek. Všetky vzorky boli negatívne na iné HPV genotypy.

Vrámci analýzy bolo testovaných 40 HPV33 pozitívnych vzoriek a 57 HPV51 pozitívnych vzoriek cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov od žien vo veku od 20 do 56 rokov. Zo získaných dát bola stanovená senzitivita a špecificita novo navrhnutých detekčných systémov. U všetkých testovaných patientských vzoriek bola určená analýza I/Z/E formy HPV (tab. 10, príloha 5, príloha 6). Analytická senzitivita novo navrhnutých detekčných metód bola vypočítaná podľa: $SE = TP / (TP + FN)$, kde SE diagnostického testu spočíva v presnej analýze pacienta s onemocnením (skutočná miera pozitivity). Špecificita bola vypočítaná podľa vzorca: $SP = TN / (TN + FP)$, kde SP diagnostického testu je naopak schopnosť správne analyzovať jedincov, ktorí onemocnenie nemajú (skutočná miera negativity) (Koliopoulos *et al.*, 2017; Mangrulkar, 2013).

Zo 40 vzoriek, u ktorých bola PapilloCheck[®] HPV-Screening testom detekovaná prítomnosť HV33, potvrdila novo navrhnutá metóda HPV33 pozitivitu u 38 vzoriek (95 %). Integrovaná forma HPV33 bola prítomná u 67,5 %, zmiešaná v 7,5 % a epizomálna v 20 % vzoriek. Detekcia HPV33 nebola potvrdená v 5 % (tab. 10, príloha 5). Analytická senzitivita detekčnej metódy bola 95 %; $SE = 38 / (38 + 2)$. Špecificita vypočítaná z dát bola 100 %; $SP = 20 / (20 + 0)$. Klinická informácia o výsledkoch cytologického alebo histologického vyšetrenia

v krátkom časovom rozmedzí bola dostupná len u 50 % výsledkov (20/40) pre HPV33. Integrovaná forma HPV33 bola detekovaná u vzoriek s L-SIL (5krát), H-SIL (2krát), CIN3 (4krát), ASC-H (1krát) a ASC-US (4krát) (príloha 5). V analýze bola epizomálna forma zistená u 1 vzorky v prípade L-SIL i H-SIL a u 2 vzoriek, ktoré nevykazovali neoplastickú intraepiteliárnu zmenu. Zmiešaná forma nebola detekovaná u žiadnej dostupnej vzorky s klinickou informáciou.

PapilloCheck[®] HPV-Screening detekoval HPV51 u 57 vzoriek. Novo navrhnutý test potvrdil prítomnosť HPV51 u 56 vzoriek cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov (98,3 %), z toho u týchto vzoriek bola identifikovaná len epizomálna forma HPV. HPV51 nebola detekovaná v 1,7 % vzoriek (tab. 10, príloha 6). Analytická senzitivita detekčnej metódy bola 98,2 %; SE = 56/(56 + 1). Analytická špecificita vypočítaná z dát bola 100 %; SP = 19/(19 + 0). Klinická informácia o výsledkoch cytologického alebo histologického vyšetrenia v krátkom časovom rozmedzí bola dostupná len u 40,4 % výsledkov (23/57) pre HPV51 (príloha 6). Najväčší počet dostupných klinických výsledkov pre HPV51 bol u L-SIL (13/23 vzoriek) a ASC-H (5/23 vzoriek). Ostatné neoplastické zmeny boli dostupné v nižšom zastúpení 2krát H-SIL, 2krát CIN1, 2krát CIN3 a 3krát pre ASC-US. Všetky tieto vzorky vykazovali epizomálnu formu HPV infekcie. Pre presnejšiu interpretáciu výsledkov histologického a cytologického vyšetrenia by bolo potrebné mať dostupné údaje zo všetkých cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov.

Tab. 10: Detekcia 40 vzoriek na HV33 a 57 vzoriek na HPV51 na určenie I/Z/E formy HPV.

typ HPV	I	Z	E	ND
HPV33	27 (67,5 %)	3 (7,5 %)	8 (20 %)	2 (5 %)
HPV51	-	-	56 (98,3 %)	1 (1,7 %)

* I - integrovaná (<0,4), Z - zmiešaná (0,4-0,8), E - epizomálna (>0,8), ND – nedetekovaná forma HPV

Novo navrhnuté detekčné systémy sú schopné detekovať nízke počty kópií vo vzorku v prípade HPV33. U HPV51 genotypu to nebolo potvrdené, kde simulácia reálnej vzorky nebola schopná detekovať gény E2 a E6 s pridanou CEM DNA. Detekčné testy umožňujú analyzovať v multiplexu dva HPV gény a internú kontrolu a rozlíšiť prítomnosť I, Z a E formu HPV infekcie. Z dôvodu malého počtu vzoriek, ku ktorým bola dostupná klinická informácia z cytologického a histologického vyšetrenia len u 46,7 %, nie je možné vyvodiť relevantné závery asociácie formy HPV s výsledkami vyšetrení.

7 DISKUSIA

Vrámci diplomovej práce bolo testovaných 97 patientských vzoriek cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov od pacientiek vo veku 20-56 rokov pozitívnych na HPV33 alebo HV51 prostredníctvom HPV testov: cobas[®] 4800 HPV Test (Roche) a Pre PapilloCheck[®] HPV-Screening (Greiner Bio-One). Vzorky cervikálnych sterov boli poslané z kolposkopických poradní, IVF klinik a cerviko-vaginálne stery boli získané prostredníctvom samoodberovej sady. Opakovanou analýzou bola u 40 vzoriek potvrdená prítomnosť HPV33 v 95 %. U 57 vzoriek bola potvrdená prítomnosť HPV51 v 98,3 %. Tieto vírusy patria medzi vysoko-rizikové HPV spôsobujúce vznik cervikálnych intraepiteliárnych lézií a cervikálneho karcinómu (Burd, 2003).

Podľa získaných výsledkov novo navrhnutých detekčných systémov bola stanovená 95% analytická SE pre HPV33 a 98,2% SE pre HV51. Analytická SP bola pre obidva HPV genotypy 100 %. Nové testy sú skôr vhodné na experimentálne účely, overenie HPV positivity pre HPV33 a HPV51 a na určenie formy HPV. Podľa príbalového letáku pre cobas[®] 4800 HPV Test je limit detekcie pre HPV33 150-300 kópií/ml cervikálneho steru a pre HPV51 300-600 kópií/ml (Roche, 2012). PapilloCheck[®] HPV-Screening udáva LOD pre HPV33 300 kópií/reakciu a pre HPV51 30 kópií/reakciu (Greiner Bio-One, 2011). Novo navrhnuté detekčné metódy boli schopné analyzovať až 4 kópie/reakciu u HPV33 bez/s CEM DNA, v prípade genotypu HPV51 to bolo umožnené len bez CEM DNA. U 38 vzoriek zo 40 (95 %) bola potvrdená prítomnosť HPV33. Integrovaná forma bola analyzovaná v 67,5 %, zmiešaná v 7,5 % a epizomálna v 20 % prípadov. Zmiešaná forma HPV býva detekovaná u CIN a integrovaná je spájaná s vysokým rizikom progresie z prekarcerózných lézií do CCa (Peitsaro *et al.*, 2002). Perzistentná infekcia HPV33 spôsobuje najmä vznik H-SIL (Khouadri *et al.*, 2006). Táto analýza zistila výskyt H-SIL v 3 prípadoch podľa histologického vyšetrenia (2krát ako I, 1krát ako E forma) a v 4 prípadoch podľa cytologického vyšetrenia (CIN3; v I forme). Väčší počet výsledkov bol dostupný u L-SIL (5krát v I forme a 1krát v E forme). U 56 vzoriek z 57 bola potvrdená prítomnosť HPV51 (98,3 %). Všetky tieto vzorky boli analyzované len na prítomnosť epizomálnej formy HPV (98,3 %). Väčšie zastúpenie HPV51 bolo detekované u L-SIL než u H-SIL (Hwang *et al.*, 2004). Analýza tieto údaje potvrdila, kde bol identifikovaný najväčší počet dostupných výsledkov pozitívnych na HPV51 u L-SIL (13/23 vzoriek) a ASC-H (5/23 vzoriek).

8 ZÁVER

Ľudské papilomavírusy HPV33 a HPV51 sú jednými z 15-tich vysokorizikových infekcií zodpovedajúcich za vznik cervikálneho karcinómu (Muñoz *et al.*, 2003). V procese progresie postupuje cez tri predrakovinné štádiá, klasifikované podľa *Bethesda* systému ako cervikálne intraepiteliárne neoplázie, trvajúce zvyčajne 10-20 rokov kým by nadobudli podobu karcinómu (Burd, 2003). Diagnostika HPV je v dnešnej dobe poskytovaná buď ako cytologický screening alebo v kombinácii s HPV DNA/RNA diagnostikou (Wentzensen *et al.*, 2016), ktorá ponúka výhody oboch metód. A to vysokú citlivosť HPV testov (až 100 %) a vysokú špecificitu cytológie (98-99 %) (WHO, 2002). Nevýhoda HPV testov je zapríčinená nižšou špecificitou, ktorá detekuje i prechodnú/tranzientnú HPV infekciu u žien do 30 rokov. Tá je vo väčšine prípadov eliminovaná imunitným systémom do 1-2 rokov a nespôsobí vznik a progresiu prekarcerózných lézií do cervikálneho karcinómu (Kim & Kim, 2017). V súčasnosti sú vyvíjané tzv. triážové testy, ktoré by vybrali hrHPV+ pozitívne ženy s vysokým rizikom progresie do CCa a tie by boli odoslané na kolposkopiu (Valentine *et al.*, 2016). Nové markery by zároveň pomohli k presnejšej interpretácii výsledkov s nižšou mierou odporúčania na kolposkopiu (Wentzensen *et al.*, 2016).

Opakovaná analýza potvrdila prítomnosť hrHPV33 v 95 % a hrHPV51 v 98,3 % prípadoch cervikálnych alebo cerviko-vaginálnych sterov. Novo navrhnuté detekčné testy dosahovali 95% senzitivitu pre HPV33 a 98,2% pre HPV51. Špecificita získaná z dát bola pre obidva HPV genotypy 100 %. Navrhnuté detekčné systémy umožnili detekovať 4 kópie/reakciu u HPV33. Zároveň umožňovali analyzovať v multiplexu dva HPV gény, internú kontrolu a rozlíšiť prítomnosť I, Z a E formu HPV infekcie. Forma HPV infekcie bola zistená v 67,5 % v I, 7,5 % v Z a v 20 % v E forme u HPV33. V prípade HPV51 bola analyzovaná len epizomálna forma v 98,3 % patientských vzoriek. Zmiešaná forma HPV je najčastejšie detekovaná u prekarcerózných lézií, s integrovanou formou je spojená rizikom progresie do cervikálneho karcinómu (Peitsaro *et al.*, 2002). Zvýšené riziko vývoja cervikálneho karcinómu je spojené práve s CIN2 do CIN3 v 16 % v priebehu 2 rokov a v 25 % v priebehu 5 rokov (Burd, 2003). Vzorky diagnostikované na ASC-US, ktoré boli v 4krát u HPV33 a 3krát u HPV51 by mali byť opakovane testované. V prípade pozitivity by mali byť pacientky odoslané na kolposkopické vyšetrenie (Wentzensen *et al.*, 2016).

Zoznam použitej literatúry

ACOG - The American College of Obstetricians and Gynecologists. 2012. ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists: Screening for Cervical Cancer. Prevzaté z <http://www.hpv16and18.com/hcp/cervical-cancer-screening-guidelines/acog-guidelines.html>, 27.10.2017.

ACS. Simon S. 2014. FDA Approves HPV Test as First Line Screening for Cervical Cancer. Prevzaté z <https://www.cancer.org/latest-news/fda-approves-hpv-test-as-first-line-screening-for-cervical-cancer.html>, 27.10.2017.

Agorastos, T.; Chatzistamatiou, K.; Katsamagkas, T.; Koliopoulos, G.; Daponte, A.; Constantinidis, T. & HERMES study group. 2015. Primary screening for cervical cancer based on high-risk human papillomavirus (HPV) detection and HPV 16 and HPV 18 genotyping, in comparison to cytology. *PloS one.* **10 (3):** e0119755.

Arbyn, M.; Snijders, P. J. F.; Meijer, C. J. L. M.; Berkhof, J.; Cuschieri, K.; Kocjan, B. J.; Poljak, M. 2015. Which high-risk HPV assay fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin microbiol Infect.* **21 (9):** 817-826.

Berkhof, J.; Coupé, V. M.; Bogaards, J. A.; van Kemenade, F. J.; Helmerhorst, T. J.; Snijders, P. J.; Meijer, C. J. 2010. The health and economic effects of HPV DNA screening in The Netherlands. *International journal of cancer.* **127 (9):** 2147-2158.

Bulkmans, N. W. J.; Berkhof, J.; Rozendaal, L.; Van Kemenade, F. J.; Boeke, A. J. P.; Bulk, S.; ... & Ruitinga, W. 2007. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *The Lancet.* **370 (9601):** 1764-1772.

Burd, E. M. 2003. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews.* **16 (1):** 1–17.

Bruni, L.; Barrionuevo-Rosas, L.; Albero, G; Serrano, B.; Mena, M.; Gómez, D.; Muñoz, J.; Bosch, F. X.; de Sanjosé, S. 2017. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Czech Republic. Summary Report 27. Prevzaté z <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/CZE.pdf>, 5.9.2017.

Carozzi, F. M.; Del Mistro, A.; Cuschieri, K.; Frayle, H.; Sani, C.; Burroni, E. 2016. HPV testing for primary cervical screening: Laboratory issues and evolving requirements for robust quality assurance. *J Clin Virol.* **76 (1)**: 22-28.

Cox, J. T.; Castle, P. E.; Behrens, C. M.; Sharma, A.; Wright, T. C.; Cuzick, J. 2013. Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: results from the ATHENA HPV study. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* **208 (3)**: 184-e1.

Dalstein, V.; Merlin, S.; Bali, C.; Saunier, M.; Dachez, R.; Ronsin, C. 2009. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods.* **156**: 77-83.

De Strooper, L. M. A.; Verhoef, V. M. J.; Berkhof, J.; Hesselink, A. T.; de Bruin, H. M. E.; van Kemenade, F. J.; Bosgraaf, R. P.; Bekkers, R. L. M.; Massuger, L. F. A. G.; Melchers, W. J. G.; Steenbergen, R. D. M.; Snijders, P. J. F.; Meijer, Ch. J. L. M.; Heideman, D. A. M. 2016. Validation of the *FAM19A4/mir124-2* DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol Oncol.* **141 (2)**: 341-347. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.02.012.

Del Mistro, A.; Frayle, H.; Rizzi, M.; Fantin, G.; Ferro, A.; Angeletti, P. M.; Rossi, P. G.; Altobelli, E. 2017. Methylation analysis and HPV genotyping of self-collected cervical samples from women not responding to screening invitation and review of the literature. *PLoS ONE.* **12 (3)**: e0172226. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0172226>.

Depuydt, C. E.; Thys, S.; Beert, J.; Jonckheere, J.; Salembier, G.; Bogers, J. J. 2016. Linear viral load increase of a single HPV-type in women with multiple HPV infections predicts progression to cervical cancer. *International journal of cancer.* **139 (9)**: 2021-2032.

Dijkstra, M. G.; Snijders, P. J.; Arbyn, M.; Rijkaart, D. C.; Berkhof, J.; Meijer, C. J. 2014. Cervical cancer screening: on the way to a shift from cytology to full molecular screening. *Ann Oncol.* **25(5)**: 927-35.

Durzynska, J.; Lesniewicz, K.; Poreba, E. 2017. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutation research-reviews in mutation research.* **772**: 36-50.

Fisher, C. 2015. Recent insights into the control of human papillomavirus (HPV) genome stability, loss, and degradation. *Journal of clinical medicine*. **4 (2)**: 204-230.

Giroglou, T.; Florin, L.; Schäfer, F.; Streeck, R. E.; Sapp, M. 2001. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*. **75 (3)**: 1565–1570. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1565-1570.2001>.

Greiner Bio-One. GmbH. 2011. PapilloCheck® high-risk Instructions For Use. BQ-O65-01. Germany. prevzaté a stiahnuté: 16. 4. 2018 z <http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/English%20files%20for%20the%20UK%20website/Instructions%20for%20use%20files/IFU%20Papillocheck%20HR.pdf>.

Hesselink, T.; Heideman, D. A. M.; Berkhof, J.; Topal, F.; Pol, R. P.; Meijer, C. J. L. M.; Snijders, P. J. F. 2010. Comparison of the Clinical Performance of PapilloCheck Human Papillomavirus Detection with That of the GP5+/6+-PCR-Enzyme Immunoassay in Population-Based Cervical Screening. *J Clin Microbiol*. **48 (3)**: 797-801.

Hoste, G.; Vossaert, K.; Poppe, W. A. J. 2013. The clinical role of HPV testing in primary and secondary cervical cancer screening. *Obstetrics and gynecology international*. 2013.

Hwang, H. S.; Park, M., Lee; S. Y., Kwon; K. H.; Pang, M. G. 2004. Distribution and prevalence of human papillomavirus genotypes in routine pap smear of 2,470 Korean women determined by DNA chip. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. **13 (12)**: 2153-2156.

Ikenberg, H.; Bergeron, C.; Schmidt, D.; Griesser, H.; Alameda, F.; Angeloni, C.; Keller, T. 2013. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *Journal of the National Cancer Institute*. **105 (20)**: 1550-1557.

Joura, E. A.; Giuliano, A. R.; Iversen, O. E.; Bouchard, C.; Mao, C.; Mehlsen, J.; Moreira, E. D. Jr.; Ngan, Y.; Petersen, L. K.; Lazcano-Ponce, E.; Pitisuttithum, P.; Restrepo, J. A.; Stuart, G.; Woelber, L.; Yang, Y. C.; Cuzick, J.; Garland, S. M.; Huh, W.; Kjaer, S. K.; Bautista, O. M.; Chan, I. S.; Chen, J.; Gesser, R.; Moeller, E.; Ritter, M.; Vuocolo, S.; Luxembourg, A. 2015. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med*. **372 (8)**: 711-23. doi: [10.1056/NEJMoa1405044](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1405044).

Khouadri, S.; Villa, L. L.; Gagnon, S.; Koushik, A.; Richardson, H.; Ferreira, S.; Tellier, P.; Simao, J.; Matlashewski, G.; Roger, M.; Franco, E. L. 2006. Human papillomavirus type 33 polymorphisms and high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *The Journal of infectious diseases*. **194 (7)**: pp.886-894.

Kim, H. J. & Kim H. J. 2017. Current status and future prospects for human papillomavirus vaccines. *Arch Pharm Res*. **40 (9)**: 1050-1063.

Kitchener, H. C.; Almonte, M.; Thomson, C.; Wheeler, P.; Sargent, A.; Stoykova, B.; Desai, M. 2009. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial. *The lancet oncology*. **10 (7)**: 672-682.

Koliopoulos, G.; Nyaga, V. N.; Santesso, N.; Bryant, A.; Martin-Hirsch, P. P. L.; Mustafa, R. A.; Schünemann, H.; Paraskevidis, E.; Arbyn, M. 2017. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database of Systematic Reviews 2017*. Issue 8. Art. No.: CD008587. DOI: 10.1002/14651858.CD008587.pub2.

Liao, Y.; Zhou, Y.; Guo, Q.; Xie, X.; Luo, E.; Li, J.; Li, Q. 2013. Simultaneous detection, genotyping, and quantification of human papillomaviruses by multicolor real-time PCR and melting curve analysis. *Journal of clinical microbiology*. **51 (2)**: 429-435.

Mangrulkar, R. S. 2013. Patients and Populations. Medical Decision-Making: Diagnostic Reasoning I and II. Prezentované z https://open.umich.edu/sites/default/files/downloads/m1_pp_lecture_7_and_8_2013_final_syllabus.pdf, 12.4.2018.

Markowitz, L. E.; Dunne, E.; Saraiya, M.; Lawson, H.; Chesson, H.; Unger, E. R. 2007. Quadrivalent human papillomavirus vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. **56 (2)**: 1-24.

Martinková, J. 2016. Formy HPV infekcie u žien s rizikom cervikálneho karcinómu. Bakalárska práca. Prezentované z <https://theses.cz/id/h33dys>, 30.8.2017.

McBride, A. A. & Warburton, A. 2017. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS pathogens*. **13 (4)**: e1006211.

Meijer, C. J.; Berkhof, J.; Castle, P. E.; Hesselink, A. T.; Franco, E. L.; Ronco, G.; Arbyn, M.; Bosch, F. X.; Cuzick, J.; Dillner, J.; Heideman, D. A.; Snijders, P. J. 2009. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. **124 (3)**: 516-520.

Molijn, A.; Kleter, B.; Quint, W.; van Doorn, L. J. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. **32 (1)**: 43-51.

Muñoz, N.; Bosch, F. X.; de Sanjosé, S.; Herrero R.; Castellsagué, X.; Shah, K. V.; Snijders, P. J.; Meijer, C. J. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. **348**: 518-527.

Mureșan, D.; Rotar, I. C.; Apostol, S.; Coroiu, G.; Stamatian, F. 2016. HPV immunohistochemical testing and cervical dysplasia. *Clujul Medical*. **89 (2)**: 236.

Naucner, P.; Ryd, W.; Törnberg, S.; Strand, A.; Wadell, G.; Elfgrén, K.; Hansson, B. G. 2007. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *New England Journal of Medicine*. **357 (16)**: 1589-1597.

Omland, T.; Lie, K. A.; Akre, H.; Sandlie, L. E.; Jebsen, P.; Sandvik, L.; Nymoén, D. A.; Bzhalava, D.; Dillner, J.; Brøndbo, K. 2014 Recurrent Respiratory Papillomatosis: HPV Genotypes and Risk of High-Grade Laryngeal Neoplasia. *PLoS ONE* **9 (6)**: e99114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099114>.

Ondryášová, H.; Koudeláková, V.; Vaněk, P.; Oborná, I.; Hajdúch, M. 2015. Lidský papilomavirus a s ním spojená onemocnění. *Practicus*. **4**: 11-15.

Ondryášová, H.; Koudeláková, V.; Hajdúch, M. 2013. Karcinom cervixu-možnosti detekce lidského papilomaviru. *Česká gynekologie*. **78 (3)**: 289-294. ISSN 1210-7832.

Qiagen. příbalový leták a technológia k the Hybrid Capture II test-u Prevzaté z <https://www.qiagen.com/us/shop/detection-solutions/hpv-testing/digene-hc2-high-risk-hpv-dna-test/#productdetails>, <https://www.qiagen.com/us/resources/knowledge-area/hpv-na/principle%20of%20hc2%20technology/?akamai-feo=off>, 25.9.2017.

Peitsaro, P.; Johansson, B.; Syrjänen, S. 2002. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* **40**: 886-891.

Preisler, S.; Rebolj, M.; Ejegod, D.M.; Lyng, E.; Rygaard, C.; Bonde, J. 2016. Cross-reactivity profiles of hybrid capture II, cobas, and APTIMA human papillomavirus assays: split-sample study. *BMC Cancer.* **16**: 510. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2518-4>.

Roche. Příbalový leták k v CIntec® PLUS test. 2017. Prevzaté z <https://www.roche.de/diagnostics/tests-parameter/gewebediagnostik/cintec-plus.html#Merkmale>, 23.10.2017.

Roche. príbalový leták a technológia k QIASure Methylation Test Kit-u Prevzaté z <https://b2b.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/#orderinginformation>, <http://rcostoya.com/uploads/galerias/con818/lab-brochure-qiasure-ii.pdf>, 2.3.2018.

Roche. GmbH RD. 2012. Příbalový leták k Cobas® 4800 HPV Test. Roche Molecular Systems Inc. Prevzaté a stiahnuté 16.4.2018 z https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/p100020s017c.pdf.

Ronco, G.; Dillner, J.; Elfström, K. M.; Tunesi, S.; Snijders, P. J. F.; Arbyn, M.; Kitchener, H.; Segnan, N.; Gilham, C.; Giorgi-Rossi, P.; Berkhof, J.; Peto, J.; Meijer, Ch. J. L. M. 2014. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet.* **383**: 524-532.

Ronco, G.; Giorgi-Rossi, P.; Carozzi, F.; Confortini, M.; Dalla Palma, P.; Del Mistro, A.; Naldoni, C. 2010. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *The lancet oncology.* **11 (3)**: 249-257.

Sadovský O. 2014. Skrining rakoviny krčka maternice na Slovensku. *Onkológia.* **9 (3)**: 144-148.

Schmitt, M.; Bravo, I. G.; Snijders, P. J.; Gissmann, L.; Pawlita, M.; Waterboer, T. 2006. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* **44 (2)**: 504-512.

Schmitz, M.; Driesch, C.; Beer-Grondke, K.; Jansen, L.; Runnebaum, I. B.; Dürst, M. 2012. Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration. *Int. J. Cancer*. **131**: E593–E602. doi:10.1002/ijc.27433.

Shanmugasundaram, S. & You, J. 2017. Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*. **9 (8)**: 229.

Sláma, J. 2017. Současné limity prevence karcinomu děložního hrdla v České republice. *Česká gynekologie*. **82 (6)**: 482-486.

Small, W.; Bacon, M. A.; Bajaj, A.; Chuang, L. T.; Fisher, B. J.; Harkenrider, M. M.; Jhingran, A.; Kitchener, H. C.; Mileskin, L. R.; Viswanathan, A. N.; Gaffney, D. K. 2017. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. **123**: 2404–2412.

Stillo, M.; Carrillo Santistevé, P.; Lopalco, P. L. 2015. Safety of human papillomavirus vaccines: a review. *Expert opinion on drug safety*. **14 (5)**: 697-712.

Tachezy, R.; Smahelova, J.; Kaspirkova, J.; Salakova, M. 2013. Human Papillomavirus Type-Specific Prevalence in the Cervical Cancer Screening Population of Czech Women. *PLoS ONE*. **8 (11)**: e79156.

Tjalma, W. A. A. 2017. Diagnostic performance of dual-staining cytology for cervical cancer screening: A systematic literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. **210**: 275-280.

Trottier, H. & Franco, E. L. 2006. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. **24**: 1-15.

Turyna, R.; Sláma, J.; Hejda, V. 2010. Kolposkopie děložního hrdla. Praha: *Galén*. s. 173. ISBN 978-80-7262-679-3.

Valentine, K.; Vanden Broeck, D.; Benoy, I.; Truyens, M.; Bogers, J. 2016. Cytology at the Time of HPV: Some Things to Think about when Discussing HPV. *Acta Cytologica*. **60**: 527-533.

van Baars, R.; van der Marel, J.; Snijders, P. J.; Rodriguez-Manfredi, A.; ter Harmsel, B.; van den Munckhof, H. A.; Meijer, C. J. 2016. CADM1 and MAL methylation status in

cervical scrapes is representative of the most severe underlying lesion in women with multiple cervical biopsies. *International journal of cancer*. **138 (2)**: 463-471.

van Baars, R.; Bosgraaf, R. P.; ter Harmsel, B. W. A.; Melchers, W. J. G.; Quint, W. G. V.; Bekkers, R. L. M. 2012. Dry Storage and Transport of a Cervicovaginal Self-Sample by Use of the Evalyn Brush, Providing Reliable Human Papillomavirus Detection Combined with Comfort for Women. *Journal of Clinical Microbiology*. **50 (12)**: 3937–3943. <http://doi.org/10.1128/JCM.01506-12>.

Vega-Peña, A.; Illades-Aguiar, B.; Flores-Alfaro, E.; López-Bayghen, E.; Leyva-Vázquez, M. A.; Castañeda-Saucedo, E.; Alarcón-Romero, L. D. C. 2013. Risk of progression of early cervical lesions is associated with integration and persistence of HPV-16 and expression of E6, Ki-67, and telomerase. *Journal of Cytology/Indian Academy of Cytologists*. **30 (4)**: 226.

Wentzensen, N.; Schiffman, M.; Palmer, T.; Arbyn, M. 2016. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol*. **76**: 49-55.

WHO (World Health Organization). 2014. Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice. 2nd edition. Geneva; Annex 4, Cancer and pre-cancer classification systems. Prevezaté z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269605/>.

WHO (World Health Organization). 2002. *Cervical cancer screening in developing countries: report of a WHO consultation*. World Health Organization. Prevezaté z http://www.who.int/cancer/media/en/cancer_cervical_37321.pdf, 15.4.2018.

Wong, Gee-Wan Oscar; Lo, C. K.; Chow, Joanne N. K.; Tsun, Obe K. L.; Szeto, Elaine; Liu, Stephanie S.; Ngan, Hextan Y. S.; Cheung, Annie N. Y. 2012. Comparison of the GenoFlow Human Papillomavirus (HPV) Test and the Linear Array Assay for HPV Screening in an Asian Population. *J Clin Microbiol*. **50 (5)**: 1691-1697.

Woodman, J. B. C.; Collins, I. S.; Young S. L. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews cancer*. **7**: 11-22.

Yanofsky, V. R.; Patel, R. V.; Goldenberg, G. 2012. Genital warts: a comprehensive review. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. **5 (6)**: 25.

Zaravinos, A.; Mammas, I. N.; Sourvinos, G.; Spandidos, D. A. 2009. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers*. **24**: 215-222.

zur Hausen, Harald. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*. vol. 2, no. 5, s. 342-50. ISSN 1474175X.

Xue, Y.; Lim, D.; Zhi, L.; He, P.; Abastado, J. P.; Thierry, F. 2012. Suppl 2: Loss of HPV16 E2 Protein Expression Without Disruption of the E2 ORF Correlates with Carcinogenic Progression. *The open virology journal*. **6**: **163**.

Zoznam skratiek

ACS	Americká spoločnosť pre výskum rakoviny, <i>The American cancer society</i>
ACOG	Americkej spoločnosť pôrodníkov a gynekológov; <i>The American Congress of Obstetricians and Gynecologists</i>
ASC-H	atypické dlaždicové bunky, nevyklučujúce H-SIL, <i>atypical squamous cells - cannot exclude H-SIL</i>
ASC-US	atypické dlaždicové bunky nejasného významu, <i>atypical squamous cells of undetermined significance</i>
BC	bunečný cyklus, <i>cell cycle</i>
bp	počet párov báz, <i>base pairs</i>
CADM1	bunková adhézna molekula 1, <i>cell adhesion molecule 1</i>
CCa	cervikálny karcinóm, <i>cervical carcinoma (cervical cancer)</i>
CDK	cyklin-dependentné kinázy, <i>cyclin-dependent kinases</i>
CIN	cervikálna intraepiteliárna neoplázia, <i>cervical intraepithelial neoplasia</i>
CIN1	ľahká dysplázia cervikálneho epitelu
CIN2	stredná dysplázia cervikálneho epitelu
CIN3	ťažká dysplázia cervikálneho epitelu
CIS	karcinóm <i>in situ</i>
CV	koeficient variácie, <i>coefficient of variation</i>
DEPC voda	voda ošetrená prídavkom diethyl-polykarbonát-u
dNTP	zmes deoxinukleotid- trifosfátov (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
E	epizomálna forma, <i>episomal form</i>
E1	skorý gén HPV, pri replikácii HPV genómu
E2	skorý gén HPV, reguluje replikáciu a transkripciu
E2F	transkripčný faktor interagujúci s pRB
E4	skorý gén HPV, pri uvoľňovaní viriónov
E5	skorý gén HPV, znižuje degradáciu
E6	skorý onkoproteín HPV, deaktivuje p53
E7	skorý onkoproteín HPV, deaktivuje pRB
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv, <i>the US Food and Drug Administration</i>
FN	falošne negatívne, <i>false negative</i>
FP	falošne pozitívne, <i>false positive</i>
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa
HC2	the Hybrid Capture II test
HPV	ľudský papilomavírus, <i>human papillomavirus</i>

hrHPV	vysoko-rizikový typ HPV <i>high-risk HPV</i>
H-SIL	ťažké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie, <i>high-grade squamous intraepithelial lesion</i>
I	integrovaná forma, <i>integral form</i>
IVF	in vitro fertilizácia, umelé oplodnenie
Ki-67	proliferačný proteín (marker)
KR	kalibračná rada
L1	neskorý proteín HPV, hlavný majoritný kapsidový proteín
L2	neskorý proteín HPV, malý minoritný kapsidový proteín
LOD	limit detekcie, <i>limit of detection</i>
LCR	dlhá kontrolná oblasť, <i>long control region</i>
lrHPV	nízko-rizikový typ HPV, <i>low-risk HPV</i>
L-SIL	ľahké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie, <i>low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
MAL	proteín asociovaný s maturáciou T-lymfocytov, <i>protein associated with human T-cell differentiation</i>
N	negatívne
NC	negatívna kontrola, <i>negative control</i>
ND	nedetekované, <i>not detected</i>
NZ	neoplastická zmena
ORF	otvorený čítací rámec, <i>open reading frame</i>
p16 ^{INK4A}	CDK4 inhibitor p16-INK4A
p53	tumorsupresorový proteín, transkripčný faktor
p97	skorý promotor HPV
Pap test	<i>Papanicolaou test</i>
PC	pozitívna kontrola, <i>positive control</i>
PCR	polymerázová reťazová reakcia, <i>polymerase chain reaction</i>
pRB	retinoblastómový proteín, <i>retinoblastoma protein</i>
PFw	primer forward
PRw	primer reverse
qMSP	multiplex real-time metylačne-špecifická PCR
real-time PCR	kvantitatívna PCR s detekciou v reálnom čase
SD	smerodatná odchýlka
SE	klinická senzitivita, <i>sensitivity</i>
SP	klinická špecificita, <i>specificity</i>
TN	skutočne negatívne, <i>true negative</i>
TP	skutočne pozitívne, <i>true positive</i>
Z	zmiešaná forma, <i>mixed form</i>

Prílohy

Príloha 1: Porovnanie CV koncentrácie a Cp hodnôt KR a SD KR pre E2 gén u HPV33.

rozpätie (kópie/ reakciu)	Plazmid s genómom HPV33 bez CEM DNA priemer ± SD		Plazmid s genómom HPV33 + 50 ng CEM DNA priemer ± SD		CV (%) (SD/priemer)×100	
	koncentrácia	Cp	koncentrácia	Cp	koncentrácia	Cp
400 000	306833.33	19.50	245166.67	19.58	276000	19.54
	±	±	±	±	±	±
	10945.57	0.06	3804.24	0.03	43604.92 (15.8 %)	0.06 (0.3 %)
40 000	49916.67	22.53	55866.67	22.61	52891.67	22.57
	±	±	±	±	±	±
	1579.47	0.05	1349.90	0.05	4207.29 (8 %)	0.06 (0.3 %)
4 000	5365.00	26.24	7021.67	26.91	6193.34	26.58
	±	±	±	±	±	±
	159.14	0.05	1386.56	0.40	1171.44 (19 %)	0.47 (1.8 %)
400	353.33	30.83	239.17	33.98	296.25	32.4
	±	±	±	±	±	±
	86.87	0.39	95.52	0.94	80.72 (27.3 %)	2.23 (6.9 %)
40	41.20	34.04	35.83	37.18	38.52	35.61
	±	±	±	±	±	±
	11.23	0.38	13.23	0.74	3.8 (10 %)	2.22 (6.2 %)
4	3.31	37.15	4.39	39.90	3.85	38.53
	±	±	±	±	±	±
	1.07	0.40	0.64	0.17	0.76 (20 %)	1.9 (5.1 %)
priemer				16.6 %	3.4 %	

Príloha 2: Porovnanie CV koncentrácie a Cp hodnôt KR a SD KR pre E6 gén u HPV33.

rozpätie (kópie/ reakciu)	Plazmid s genómom HPV33 bez CEM DNA priemer ± SD		Plazmid s genómom HPV33 + 50 ng CEM DNA priemer ± SD		CV (%) (SD/priemer)×100	
	koncentrácia	Cp	koncentrácia	Cp	koncentrácia	Cp
400 000	312000.00	19.70	246000	19.78	279000	19.74
	±	±	±	±	±	±
	11460.08	0.06	5300	0.04	46669.05 (17 %)	0.06 (0.3 %)
40 000	48950.00	22.73	55100	22.81	52025	22.77
	±	±	±	±	±	±
	838.15	0.03	1600	0.06	4348.71 (8.4 %)	0.06 (0.25 %)
4 000	5225.00	26.40	6790	27.09	6007.5	26.75
	±	±	±	±	±	±
	120.66	0.04	1270	0.37	1106.62 (18.4 %)	0.49 (1.8 %)
400	330.00	30.95	249	33.87	289.5	32.41
	±	±	±	±	±	±
	62.66	0.31	83.1	0.74	57.28 (20 %)	2.06 (6.4 %)
40	41.72	34.12	36.5	37.13	39.11	35.63
	±	±	±	±	±	±
	7.76	0.27	12.0	0.64	3.7 (9.4 %)	2.13 (6 %)
4	3.88	37.34	4.81	39.81	4.35	38.58
	±	±	±	±	±	±
	0.89	0.32	1.11	0.27	0.66 (15.1 %)	1.75 (4.5 %)
priemer				14.6 %	3.2 %	

Príloha 3: Porovnanie CV koncentrácie a Cp hodnôt KR a SD KR pre E2 gén u HPV51.

rozpätie (kópie/ reakciu)	Plazmid s genómom HPV51 bez CEM DNA priemer ± SD		Plazmid s genómom HPV51 + 50 ng CEM DNA priemer ± SD		CV (%) (SD/priemer)×100	
	koncentrácia	Cp	koncentrácia	Cp	koncentrácia	Cp
400 000	335000	20.89	279000	20.86	307000	20.88
	±	±	±	±	±	±
	6.930	0.04	6090	0.04	39597.98 (13 %)	0.02 (0.1 %)
40 000	53900	24.00	58100	24.05	56000	24.03
	±	±	±	±	±	±
	1660	0.05	2720	0.10	2969.85 (5.3 %)	0.04 (0.15 %)
4 000	4410	28.28	4140	29.51	4275	28.9
	±	±	±	±	±	±
	759	0.28	1090	0.59	190.92 (4.5 %)	0.87 (3 %)
400	314	32.76	355	34.45	334.5	33.61
	±	±	±	±	±	±
	32.4	0.17	80.4	0.44	28.99 (8.7 %)	1.2 (3.6 %)
40	51.0	35.94	36.6	37.65	43.8	36.8
	±	±	±	±	±	±
	17.9	0.58	29.9	1.35	10.18 (23.3 %)	1.21 (3.3 %)
4	9.40	39.25	-	-	-	-
	±	±	-	-	-	-
	9.35	1.30	-	-	-	-
priemer					10.9 %	2.02 %

Príloha 4: Porovnanie CV koncentrácie a Cp hodnôt KR a SD KR pre E6 gén u HPV51.

rozpätie (kópie/ reakciu)	Plazmid s genómom HPV51 bez CEM DNA priemer ± SD		Plazmid s genómom HPV51 + 50 ng CEM DNA priemer ± SD		CV (%) (SD/priemer)×100	
	koncentrácia	Cp	koncentrácia	Cp	koncentrácia	Cp
400 000	331000	20.60	301000	20.55	316000	20.58
	±	±	±	±	±	±
	6920	0.04	6870	0.04	21213.20 (6.7 %)	0.04 (0.17 %)
40 000	50600	23.68	53600	23.70	52100	23.69
	±	±	±	±	±	±
	1600	0.05	2.690	0.09	2121.32 (4.1 %)	0.01 (0.06 %)
4 000	4520	27.65	4200	28.41	4360	28.03
	±	±	±	±	±	±
	504	0.18	981	0.47	226.27 (5.2 %)	0.54 (1.9 %)
400	344	31.86	326	33.02	335	32.44
	±	±	±	±	±	±
	25.5	0.13	2.8.7	0.16	12.73 (3.8 %)	0.82 (2.5 %)
40	43.2	35.34	36.0	36.31	39.6	35.83
	±	±	±	±	±	±
	13.8	0.52	11.0	0.50	5.1 (12.9 %)	0.69 (1.9 %)
4	7.62	38.73	-	-	-	-
	±	±	-	-	-	-
	6.80	1.41	-	-	-	-
priemer					6.5 %	1.3 %

* vysvetlenie skratiek **k prílohe 1-4**: KR – kalibračná rada, SD – smerodatná odchýlka, CEM – bunečná línia, CV – koeficient variácie; každý priemer koncentrácie a Cp u plazmidov (bez/s CEM DNA) bol vyhodnotený z 5-tich meraní, u prílohy 3 a 4 do priemeru CV neboli zarátané 4 kópie/reakciu.

Príloha 5: Súhrnná tabuľka a výsledky cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov na HV33.

č. vzorky	E2 (kópie/μl)	E6 (kópie/μl)	E2/E6	Forma HPV infekcie (I/Z/E)	výsledok cyt./hist. vyšetrenia
1	3940	4170	0.94	E	bez NZ
2	24300	26200	0.93	E	bez NZ
3	58.4	110	0.53	Z	
4	5880	6540	0.90	E	H-SIL
5	750	843	0.89	E	
6	20500	21100	0.97	E	L-SIL
7	24.1	35500	0.00	I	
8	35.6	120	0.30	I	CIN3
9	35.3	122	0.29	I	ASC-H
10	32.7	582	0.06	I	
11	ND	281	0.00	I	H-SIL
12	32.0	888	0.04	I	
13	38.4	4.3	8.94	E	
14	28.6	4270	0.01	I	L-SIL
15	32.6	622	0.05	I	L-SIL
16	31.3	1180	0.03	I	
17	29.7	2410	0.01	I	CIN3
18	27.9	5740	0.00	I	
19	39.6	15.6	2.53	E	
20	37.2	93.3	0.40	Z	
21	29.3	2930	0.01	I	
22	37.6	44.0	0.85	E	
23	32.8	627	0.05	I	
24	30.3	1850	0.02	I	
25	31.4	1120	0.03	I	ASC-US
26	28.5	5560	0.01	I	
27	20.1	227000	0.00	I	H-SIL
28	28.2	6120	0.00	I	
29	36.7	48.7	0.75	Z	
30	ND	92.1	0.00	I	
31	24.5	31800	0.00	I	ASC-US L-SIL
32	24.9	27000	0.00	I	L-SIL
33	35.0	337	0.10	I	
34	ND	ND	ND	ND	ASC-H
35	25.8	19300	0.00	I	L-SIL
36	36.3	268	0.14	I	CIN3
37	23.8	47400	0.00	I	ASC-US
38	ND	ND	ND	ND	
39	20.0	256000	0.00	I	ASC-US
40	25.9	20500	0.00	I	CIN3

* vysvetlenie skratiek: I – integrovaná forma HPV, Z – zmiešaná forma HPV, E – epizomálna forma HPV, ND – nedetekovaná forma HPV, NZ – neoplastická zmena, ASC-US: atypické dlaždicové bunky nejasného významu, ASC-H: atypické dlaždicové bunky nevyklučujúce prítomnosť H-SIL; CIN: cervikálna intraepiteliárna neoplázia; L-SIL: ľahké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie; H-SIL: ťažké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie

Príloha 6: Súhrnná tabuľka a výsledky cervikálnych a cerviko-vaginálnych sterov na HV51.

č. vzorky	E2 (kópie/μl)	E6 (kópie/μl)	E2/E6	Forma HPV infekcie (I/Z/E)	výsledok cyt./hist. vyšetrenia
1	4000	2830	1.41	E	
2	105000	110000	0.96	E	
3	39800	36100	1.10	E	
4	38600	35200	1.10	E	
5	425000	526000	0.81	E	H-SIL
6	17300	13400	1.29	E	ASC-H
7	37.2	27.7	1.35	E	
8	38100	35600	1.07	E	
9	54200	49300	1.10	E	
10	1630	1040	1.57	E	
11	14500	12200	1.19	E	
12	10700	8260	1.29	E	
13	26400	23300	1.13	E	L-SIL, RCC
14	9480	7260	1.31	E	
15	146	64.7	2.25	E	L-SIL
16	188000	196000	0.96	E	
17	443	269	1.64	E	
18	209000	217000	0.96	E	
19	771	462	1.67	E	
20	145	80.6	1.79	E	
21	1060	653	1.63	E	
22	127000	127000	1.00	E	ASC-H, L-SIL, RCC
23	526	280	1.88	E	
24	1720	649	2.65	E	
25	156000	170000	0.92	E	L-SIL
26	1220	749	1.62	E	CIN3
27	61200	59700	1.03	E	L-SIL
28	14800	12300	1.21	E	
29	903	567	1.59	E	L-SIL
30	5410	3350	1.61	E	ASC-H
31	4860	4320	1.13	E	ASC-H, L-SIL, RCC
32	ND	ND	ND	ND	
33	15100	12400	1.22	E	
34	2580	1610	1.60	E	CIN3
35	24300	19000	1.28	E	
36	1490	752	1.99	E	
37	780	488	1.60	E	
38	241000	243000	0.99	E	
39	16700	13300	1.26	E	ASC-US
40	39800	33900	1.17	E	
41	16000	12400	1.28	E	L-SIL
42	27000	21300	1.27	E	
43	59700	55100	1.08	E	CIN1
44	21900	18200	1.20	E	
45	58100	53900	1.08	E	

46	3450	2280	1.51	E	
47	966	662	1.46	E	
48	1180	669	1.76	E	L-SIL
49	16400	13400	1.22	E	
50	1560	833	1.87	E	L-SIL
51	284000	327000	0.87	E	ASC-US, CIN1
52	18100	13700	1.32	E	L-SIL
53	28900	25000	1.16	E	
54	37000	31800	1.16	E	ASC-H
55	34600	29500	1.17	E	H-SIL
56	55800	50700	1.10	E	L-SIL
57	9210	6650	1.38	E	ASC-US, L-SIL koilocytóza

* vysvetlenie skratiek: E – epizomálna forma HPV, ND – nedetekovaná forma HPV, ASC-US: atypické dlaždicové bunky nejasného významu, ASC-H: atypické dlaždicové bunky nevylučujúce prítomnosť H-SIL; CIN: cervikálna intraepiteliárna neoplázia; L-SIL: ľahké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie; H-SIL: ťažké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie, RCC - reaktívne bunecné zmeny spôsobené zánetom